

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A.C.**

COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS AISLADOS DE *Baccharis
glutinosa*, PARA EL CONTROL *in vitro* DE *Colletotrichum
gloeosporioides*

POR

ERNESTINA ARABELLA ALMADA RUIZ

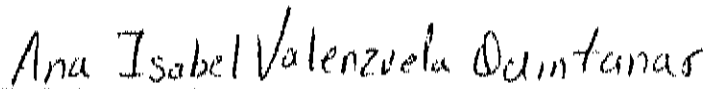
TESIS APROBADA POR LA
DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de ERNESTINA ARABELLA ALMADA RUIZ, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



DRA. IRASEMA VARGAS ARISPURO
Directora de Tesis



DRA. ANA ISABEL VALENZUELA QUINTANAR

DR. GERARDO ÁLVAREZ MANILLA-DUBÓN




DR. MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ TÉLLEZ

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos deberá contar con la autorización escrita del Director General del CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora por el apoyo otorgado, el cual permitió la realización del presente trabajo.

A la Dra. Irasema Vargas Arispuro, de quien recibí un invaluable apoyo a través de sus conocimientos y acertada dirección durante el desarrollo y presentación de mi trabajo de tesis.

A los integrantes del comité de tesis: Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar, al Dr. Gerardo Álvarez Manilla-Dubón y al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez por sus atinadas observaciones.

Al Instituto de Tecnología Química de la Universidad Politécnica de Valencia, por su colaboración para la realización de los estudios espectroscópicos e identificación del compuesto.

A la Q.B. Socorro Vallejo Cohen, por su valioso apoyo en las técnicas microbiológicas y de extracción utilizadas en el presente trabajo. Por su amistad, gracias.

A todo el personal del CIAD: académico, administrativo, de biblioteca, informática e intendencia por su amable atención durante mi estancia en este Centro.

A todos mis maestros, por compartir generosamente sus conocimientos, así como por confirmar con su ejemplo que en la búsqueda del conocimiento se encuentra un camino para nuestra superación como seres humanos. Gracias, Dr. Enrique Ramos, Dr. Inocencio Higuera, Dra. Ana María Calderón, Dra. Rosario Román, Dra. Luz Vázquez, Dra. Elisa Valenzuela, Dra. Carmen Candia, Dra. Irasema Vargas, M.C. Refugio Robles y M.C. Gabriela Ramos.

A mis compañeros de generación: Elizabeth, Griselda, Fanny, Ma. Jesús, Marina, Erica, Abril, Yolanda, Nohemí, Víctor, Ramón, Luis, Juan, Carmen y Ana María por los momentos de estudio y de celebración que compartimos.

A mis amigos de laboratorio: Javier, Rubén, Griselda y Connie por su gran apoyo en aspectos técnicos y académicos así como por brindarme su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres Javier y Ernestina

Con todo mi amor. No son suficientes las palabras para agradecerles el gran apoyo, cariño y ejemplo que siempre he recibido de ustedes.

A Carlos

Por apoyarme siempre y facilitar el camino para continuar con mi superación.

A mis hijos Carlos Andrés y Alejandro

Por ser parte fundamental de mi vida, gracias por su comprensión y cariño.

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| INDICE DE FIGURAS..... | ix |
| APÉNDICE..... | xi |
| RESUMEN..... | xiv |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 4 |
| Fungicidas Sintéticos..... | 4 |
| Generalidades..... | 4 |
| Formas de Acción..... | 4 |
| Toxicidad..... | 5 |
| Resistencia de los Fitopatógenos | 6 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 6 |
| Taxonomía..... | 6 |
| Enfermedades..... | 7 |
| Cultivos Afectados..... | 9 |
| Proceso de Infección..... | 10 |
| Control de <i>C.gloeosporioides</i> | 12 |
| Tratamientos Precosecha..... | 12 |
| Tratamientos Poscosecha..... | 12 |
| Compuestos Fungicidas en Plantas..... | 13 |
| <i>Baccharis glutinosa</i> | 15 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 18 |
| Colecta de Plantas..... | 18 |
| Obtención de Extractos..... | 18 |
| Extracto Hidroalcohólico..... | 18 |

| | Página |
|--|--------|
| Extractos Diclorometánico y Metanólico..... | 19 |
| Evaluación de la Actividad Antifúngica..... | 19 |
| Mantenimiento del Fitopatógeno..... | 19 |
| Bloensayos de Actividad Antifúngica..... | 20 |
| Aislamiento Biodirigido de Compuestos Activos..... | 21 |
| Cromatografía en Capa Fina..... | 22 |
| Cromatografía en Columna de Sílica Gel 60..... | 22 |
| Cromatografía Líquida de Alta Resolución..... | 23 |
| Identificación de Compuestos Aislados..... | 23 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | .25 |
| Rendimiento de los Extractos..... | 25 |
| Evaluación de la Actividad Antifúngica..... | 27 |
| Aislamiento Biodirigido de Compuestos Activos..... | 31 |
| Análisis de la Fracción FSA-3..... | 33 |
| Cromatografía en sílica gel 60..... | 33 |
| Cromatografía líquida de alta resolución..... | 35 |
| Purificación del producto 1..... | 35 |
| Análisis de la Fracción FSA-4..... | 40 |
| Cromatografía en sílica gel 60..... | 40 |
| Cromatografía líquida de alta resolución..... | 40 |
| Purificación e identificación del producto 2..... | 40 |
| Concentración Mínima Inhibitoria..... | 49 |
| CONCLUSIONES..... | 53 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1. | Síntomas característicos de antracnosis en frutos de mango..... | 8 |
| 2. | Proceso de infección de <i>C. gloeosporioides</i> | 11 |
| 3. | <i>Baccharis glutinosa</i> Pers..... | 17 |
| 4. | Rendimiento de los extractos hidroalcohólico, metanólico y diclorometánico obtenidos de <i>B. glutinosa</i> | 26 |
| 5. | Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de <i>B. glutinosa</i> evaluados a 500 µg mL ⁻¹ contra <i>C. gloeosporioides</i> | 28 |
| 6. | Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas de la fracción soluble en acetona (FSA) por cromatografía en sílica gel 60 evaluadas a una concentración de 300 µg mL ⁻¹ contra <i>C. gloeosporioides</i> | 32 |
| 7. | Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas de FSA-3 por cromatografía en sílica gel 60 evaluadas a una concentración de 300 µg mL ⁻¹ contra <i>C. gloeosporioides</i> | 34 |
| 8. | Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas de FSA-3-6 por cromatografía en sílica gel 60 evaluadas a una concentración de 300 µg mL ⁻¹ contra <i>C. gloeosporioides</i> | 36 |
| 9. | Cromatograma HPLC de la fracción FSA-3-6-2..... | 37 |
| 10. | Cromatograma HPLC de la fracción F4-HPLC1..... | 38 |
| 11. | Cromatograma HPLC de la Fracción F3-HPLC2..... | 39 |
| 12. | Cromatograma HPLC de la fracción FSA-4-3-6..... | 41 |
| 13. | Espectro de ¹ H RMN del compuesto 2,..... | 43 |

| Figura | Página |
|---|--------|
| 14. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2..... | 44 |
| 15. Espectro infrarrojo en pastilla de KBr del compuesto 2..... | 45 |
| 16. Espectro de masas del compuesto 2..... | 46 |
| 17. Nobiletina, 5,6,7,8,3',4' hexametoxiflavona..... | 47 |
| 18. Evaluación de la actividad antifúngica de la hexametoxiflavona y benomilo a 25, 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 50 |

APÉNDICE

Lista de Abreviaturas

APD: agar papa dextrosa

B. glutinosa: *Baccharis glutinosa*

C. gloeosporioides: *Colletotrichum gloeosporioides*

CCA: cromatografía en columna de adsorción

CCF: cromatografía en capa fina

DAD: detector en arreglo de fotodiodos

EPA: Agencia de Protección Ambiental

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación

FPA: fracción precipitada en acetona

FSA: fracción soluble en acetona

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

ppm: partes por millón

IR: infrarrojo

RMN de ^1H : resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

RMN de ^{13}C : resonancia magnética nuclear de carbono 13

UV-Vis: ultravioleta-visible

Fórmulas y abreviaturas químicas

AC: acetona

AE: acetato de etilo

CaCl_2 : cloruro de calcio

DCM: diclorometano

HA: hidroalcohólico

HEX: hexano

MeOH: metanol

NaSO₄: sulfato de sodio

KBr: bromuro de potasio

OCH₃: metoxilo

Símbolos

°C: grado centígrado

δ: desplazamiento químico en ppm

λ: longitud de onda

%: por ciento

Unidades

Hz: Hertz

g: gramo

MHz: megahertz

min.: minuto

m: mili

m/z: masa/carga

μ: micro

nm: nanómetro

mL/min: mililitro por minuto

U mA: unidades de miliabsorbancia

RESUMEN

Con el objetivo de aislar compuestos de *Baccharis glutinosa* con actividad antifúngica para el control del desarrollo micelial in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, como una alternativa al uso de los fungicidas tradicionales, se realizó el presente trabajo. El extracto obtenido con diclorometano (DCM) de hojas de *B. glutinosa* inhibió el 100% del desarrollo micelial de *C. gloeosporioides*. La actividad antifúngica se evaluó por comparación del desarrollo micelial del hongo en agar papa dextrosa con y sin tratamiento, expresando los resultados como porcentajes de inhibición. A partir del extracto DCM, se inició el proceso de aislamiento de los compuestos activos, utilizando las técnicas de cromatografía en capa fina, cromatografía en columna de adsorción y cromatografía líquida de alta resolución. La identificación de los compuestos aislados se realizó en base a sus espectros ultravioleta-visible, infrarrojo, resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y de masas. Se aislaron dos compuestos de *B. glutinosa* con 100% de actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* a una concentración de $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$; se logró la identificación de uno de ellos como Nobiletina, 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona. Los resultados obtenidos permiten proponer a los compuestos aislados de *B. glutinosa* para su evaluación en pruebas in vivo en el control de enfermedades causadas por *C. gloeosporioides*, así como para evaluar su nivel de toxicidad para considerarlos como candidatos para su utilización como fungicidas.

INTRODUCCIÓN

En los cultivos agrícolas se utilizan al año millones de toneladas de compuestos químicos para el control de plagas. El 99% de éstos se dispersa en el ambiente, lo cual representa un riesgo para la salud humana y el equilibrio de los ecosistemas (Repetto *et al.* 1995). Entre los plaguicidas utilizados para la protección de los cultivos, a los fungicidas se les consideraba relativamente seguros. Sin embargo en 1986, la Academia Nacional de Ciencias (NAS) de Estados Unidos publicó un reporte sobre residuos de plaguicidas en alimentos, en el cual se indica que los fungicidas representan un riesgo cancerígeno mayor que los insecticidas y herbicidas juntos (citado por Wilson *et al.*, 1997). Al respecto, Ecobichon (1991), menciona que casi el 90% de los fungicidas son cancerígenos en modelos animales. Además algunos de sus metabolitos producen efectos mutagénicos, teratogénicos y en la fertilidad de animales (Lentza-Rizos, 1990; Pandey y Dubey, 1994).

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos y bacterias producen grandes pérdidas en los cultivos agrícolas. Se estima que sin la aplicación de fungicidas se perdería hasta un tercio de la producción, dependiendo del cultivo. A pesar de sus efectos tóxicos, actualmente no es posible prescindir de su utilización ya que son necesarios para reducir el nivel de inseguridad alimentaria que todavía existe en algunos países, así como para prevenir pérdidas mayores en las regiones productivas (Hewitt, 1998).

Colletotrichum gloeosporioides Penz, es un hongo fitopatógeno de gran importancia económica, presenta una amplia distribución geográfica y es causa de pérdidas considerables en la producción frutícola debido al deterioro de los frutos y daño a las partes vegetativas de varias especies (Freeman *et al.*, 1996). Afecta a una gran variedad de cultivos, entre ellos, aguacate, cítricos, cacao, café, mango y papaya y es agente causal de la antracnosis, considerada la enfermedad

poscosecha más importante en cultivos tropicales y subtropicales (Jeffries *et al.*, 1990). En México se han reportado pérdidas debidas a *C. gloeosporioides*, del 25% en la producción de mango y 40% en la de aguacate (Jeffries *et al.*, 1990; Vidales, 1998), cultivos éstos muy importantes para nuestro país ya que como productor ocupa a nivel mundial el cuarto y primer lugar respectivamente (FAO, 2002). El principal tratamiento para su control es la utilización de fungicidas, principalmente benomilo, mancozeb, procloraz y compuestos de cobre, de los cuales algunos son tóxicos y otros ya no son efectivos debido a la resistencia desarrollada por este patógeno (Ploetz *et al.*, 1999)

Debido a la toxicidad de los fungicidas y al desarrollo de resistencia por un número cada vez mayor de microorganismos, una de las tendencias actuales en el control de enfermedades es la búsqueda de compuestos naturales que sean efectivos contra los fitopatógenos y seguros para los humanos y el ambiente (Pandey y Dubey, 1994; Wilson *et al.*, 1997). Una fuente de estos compuestos son las plantas superiores ya que sintetizan metabolitos secundarios que representan un recurso casi ilimitado de sustancias con diferentes actividades biológicas (Dominguez, 1973; Pandey y Dubey, 1994).

Entre las especies que han sido estudiadas por sus propiedades medicinales y fungicidas se encuentran algunas que pertenecen al género *Baccharis* (Bandoni *et al.*, 1978; Rahalison *et al.*, 1995; Ceñal *et al.*, 1997). En el suroeste de Estados Unidos y Norte de México se localiza la especie *Baccharis glutinosa*, cuyo nombre común en la región es batamote, la cual tradicionalmente se ha utilizado como antiséptico, cosmético y como infusión para problemas digestivos (DiSalvo, 1974; Roja y Weidauer, 2002). Sin embargo existen pocos estudios que relacionen su composición química y actividad biológica.

Debido al riesgo que representa el uso de los fungicidas tradicionales y con el propósito de encontrar una alternativa para el control del agente causal de la antracnosis, en el presente trabajo se planteó como objetivo: aislar e identificar compuestos antifúngicos obtenidos de *B. glutinosa* para el control del desarrollo micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides*.

ANTECEDENTES

Fungicidas Sintéticos

Generalidades

Los fungicidas son sustancias que se utilizan en los cultivos y almacenamiento de alimentos para prevenir y controlar las enfermedades causadas por hongos. Representan el 20% de las ventas de plaguicidas a nivel mundial, con un valor de 6 billones de dólares (Landels *et al.*, 1997). Anualmente se aplican a los cultivos, cerca de 2 millones de toneladas de fungicidas (Repetto *et al.*, 1995). Desde su descubrimiento, varios factores han asegurado su utilización y el crecimiento de las empresas que los producen. Entre ellos, el aumento de la población mundial, ganancias mayores y beneficios directos tanto para el productor como para el consumidor, como son: menores costos, mayor producción, mejor calidad de los alimentos, mayor variedad de productos y bajos precios (Hewwit, 1998). Los principales grupos químicos utilizados como fungicidas son compuestos de sulfato de cobre y azufre, organomercuriales, pentaclorofenoles, fenilamidas y ditiocarbamatos (Ecobichon, 1991).

Formas de acción

Según su forma de acción los fungicidas pueden ser de protección, curación o erradicación. Los primeros se aplican a la planta antes de la aparición de cualquier hongo fitopatógeno y previenen la infección ya sea por actividad esporicida o porque cambian el ambiente fisiológico en la superficie de las hojas. Los fungicidas curativos se utilizan cuando una infección ya ha comenzado a invadir la planta, el compuesto

penetra la cutícula y destruye el micelio. Los de erradicación controlan el desarrollo del hongo después de que se presentan los síntomas, eliminando tanto a las nuevas esporas como al micelio (Echobichon, 1991). Se denominan fungicidas de contacto a aquellos que actúan sobre el patógeno sólo en la superficie de los tejidos y fungicidas sistémicos a las sustancias que penetran a la planta y que pueden destruir al hongo, una vez que ha penetrado los tejidos (Agrios, 1995).

Los fungicidas pueden actuar en varias formas: inhibiendo la formación de la pared celular del hongo, afectando la permeabilidad de la célula causándole pérdida de nutrientes, combinándose con metales esenciales de tal forma que no estén disponibles para las funciones celulares normales y/o inhibiendo la respiración o la división nuclear (Mc.Mullen, 2002)

Toxicidad

La mayoría de los compuestos utilizados como fungicidas tienen un bajo orden de toxicidad para mamíferos, la DL_{50} para ratas es de 800 a 10,000 mg/Kg. Sin embargo, aproximadamente el 90% ha resultado cancerígeno en modelos animales, algunos producen metabolitos muy tóxicos y a otros se les ha relacionado con disminución de la fertilidad en animales (Lentza-Rizos, 1990; Echobichon, 1991). Muchos de los primeros fungicidas utilizados han sido prohibidos, como los organomercuriales y en algunos casos se está investigando y evaluando nuevamente su utilización, debido a su toxicidad potencial o porque los datos al respecto son incompletos, sobre todo en las áreas de teratogénesis y mutagénesis (Echobichon, 1991).

Resistencia de los Fitopatógenos

Los problemas debidos a la resistencia de los hongos a la acción de los fungicidas, se iniciaron con la introducción de los llamados fungicidas sistémicos, ya que éstos actúan sólo sobre uno o dos eventos metabólicos, por lo que se requieren pocos cambios genéticos para producir una cepa resistente (Agrios, 1995). Uno de los fungicidas sistémicos muy utilizado es el benomilo, pero a sólo dos años de iniciado su uso se detectaron cepas resistentes. Han desarrollado resistencia a este compuesto, varios hongos fitopatógenos importantes, entre ellos: *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Aspergillus* (Ploetz, 1999).

Colletotrichum gloeosporioides

Taxonomía

La clasificación de *C. gloeosporioides* (Swart, 1999) es la siguiente:

| | |
|--------------|-----------------------|
| Reino | Fungi |
| Forma-phylum | Hongo mitospórico |
| Clase | Coelomycetes |
| Subclase | Enteroblastomycetidae |
| Orden | Phialidales |
| Suborden | Phialostromatinae |

Corde estableció en 1831 el género *Colletotrichum*, para los hongos con conidios fusiformes, curvos, hialinos y acérvulos con setas (Jeffries *et al.*, 1990). Actualmente se reconoce que este género incluye más de 20 especies (Swart, 1999) entre ellas a *C. gloeosporioides*, cuyas características son: conidios hialinos,

unicelulares de forma ovoide, ligeramente curvos de 10-15 micras de longitud y 5-7 micras de ancho. Las masas de conidios son de color rosa o salmón. Los acérvulos que se producen en los tejidos infectados, son subepidérmicos, típicamente con setas y conidióforos simples, cortos y erectos. Las condiciones ambientales que favorecen su desarrollo son temperatura y humedad altas. Su temperatura óptima es de 28° C y las esporas requieren de una humedad relativa de más de 90% para germinar (Dickman, 1998).

Enfermedades

Las enfermedades causadas por este hongo incluyen antracnosis, pudrición de raíz, manchas foliares y pudrición de botones. La antracnosis afecta los frutos, tallos y hojas de una gran variedad de cultivos, se manifiesta como manchas grandes o pequeñas de colores oscuros o lesiones levemente sumidas con su contorno ligeramente levantado (figura 1). Además de las manchas foliares, puede producir la muerte descendente de las ramitas y ramas de la planta (Agrios, 1995).

Los síntomas varían muy poco entre los diferentes huéspedes; la infección de los tejidos de hojas, tallos e inflorescencias jóvenes produce lesiones negras de forma subcircular o angular. En los mangos las lesiones pueden aparecer primero en los ejes de las inflorescencias como pequeñas manchas que van creciendo hasta que se ven completamente de color oscuro y se marchitan antes del establecimiento del fruto. Si la infección ocurre en los frutos jóvenes, se producen lesiones que provocan su caída. En cambio cuando la infección se presenta en frutos mayores de 4 centímetros, generalmente la enfermedad no se desarrolla hasta que el fruto madura (Jeffries *et al.*, 1990). Esta capacidad de *C. gloeosporioides*, para

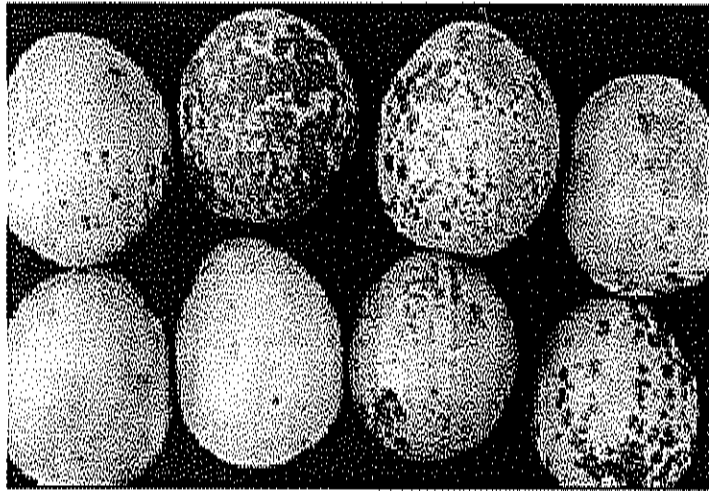


Figura 1. Síntomas característicos de antracnosis en frutos de mango.

producir infecciones latentes, lo ha incluido entre los fitopatógenos más importantes de poscosecha (Freeman *et al.*, 1998).

Cultivos Afectados

C. gloeosporioides se ha reportado como causante de enfermedades en fresas, almendras, cítricos, aguacate, cacao, café, mango, papaya y caucho, entre otras plantas (Jeffries *et al.*, 1990; Dickman, 1994; Timmer *et al.*, 1998). Es particularmente importante como patógeno latente causante de pudriciones poscosecha de frutos tropicales como el aguacate, mango y papaya. El costo económico de las infecciones latentes es proporcionalmente mayor que las pérdidas en el campo, debido a los gastos de cosecha, transporte, almacenamiento y empaquetado que deben sumarse a los de la producción (Jeffries *et al.*, 1990).

En 2001, nuestro país produjo alrededor de 1,500,000 toneladas de mango, 900,000 toneladas de aguacate y 800,000 toneladas de papaya, ocupando el cuarto, primer y segundo lugar de la producción mundial, respectivamente. México es el principal exportador de mango y aguacate; en 2001 exportó el 13% de su producción de mango, el 7% de aguacate y el 9% de papaya (FAO, 2002). Se ha reportado que *C. gloeosporioides* en México, causa cerca del 25% del total de las pérdidas poscosecha en mango (Jeffries *et al.*, 1990) y en el cultivo de aguacate se pierde hasta el 40% de la producción (Vidales, 1998). Las exportaciones mexicanas de aguacate Hass son afectadas por los síntomas ocasionados por este fitopatógeno (Zamora-Magdaleno *et al.* 2001). Esta enfermedad se encuentra diseminada en los 24 estados del país donde se produce mango, con ataques destructivos en floración, fructificación y poscosecha (Mena-Nevárez *et al.*, 1999).

En Taiwan las pérdidas en el cultivo de mango debidas a este fitopatógeno han alcanzado hasta el 60% de la producción durante la temporada fuerte de lluvia (Kuo, 2001) y se le considera el factor limitante más importante del cultivo en este país (Kuo, 1999); en Sudáfrica se pierde por antracnosis hasta el 10.6% del mango destinado a exportación y en aguacate las pérdidas son considerables, contándose con cargamentos para exportación prácticamente libres de la enfermedad y otros completamente afectados (Swart, 1999). Han sido también reportadas pérdidas en la producción de mango en la India, que van desde el 6 hasta el 30% dependiendo de la variedad y localidad del cultivo (Banik *et al.* 1996; Sharma y Badiyala, 1998), en Australia (Fitzell y Peak, 1984) y en el cultivo de mango, cítricos y papaya en Estados Unidos (Ploetz *et al.* 1996; Timmer *et al.*, 1998; Dickman, 1998). La antracnosis es un problema importante, no tanto para la producción destinada al consumo local, sino especialmente en los frutos destinados a la exportación, ya que afecta la calidad y presentación del producto disminuyendo su potencial de comercialización (Dickman, 1998).

Proceso de Infección

En la mayoría de los casos, el inóculo llega a la planta como conidios, transportados en el agua, los cuales se originan de frutos caídos infectados, hojas viejas y secciones de tallo (figura 2). La germinación ocurre de 12 a 48 horas después, en el tubo de germinación se forma un apresorio terminal y posteriormente una clavija de penetración con la cual se introduce a los tejidos. Las hifas se desarrollan tanto intercelular como intracelularmente, pero en un principio producen pocos síntomas por lo que es difícil detectarlo en esta etapa. La enfermedad se puede detener en la etapa de apresorio y no formarse hifas sino hasta la maduración de los frutos, haciéndose evidente en esta etapa (Jeffries *et al.*, 1990; Agrios, 1995).

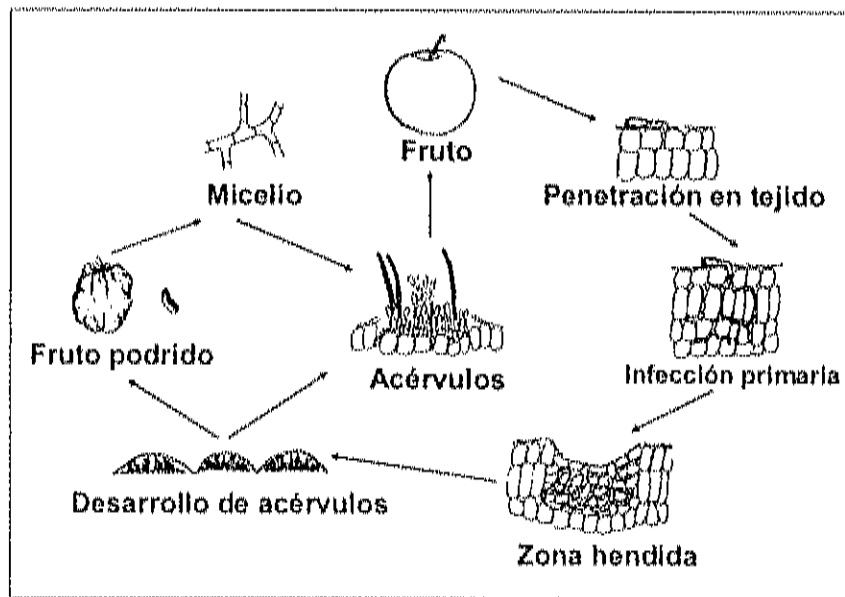


Figura 2. Proceso de infección de *C. gloeosporioides*. (Agrios, 1995)

Control de *C. gloeosporioides*

Tratamientos Precosecha

Para evitar serias pérdidas por antracnosis, se deben utilizar medidas efectivas de control que incluyan asperjeos de fungicidas tanto en precosecha como en poscosecha. Los principales tratamientos utilizados en precosecha son los siguientes: mancozeb, procloraz, benomilo y compuestos de cobre, los cuales evitan la caída de los botones si se aplican antes de la floración, aumentando hasta en un 80% el establecimiento de los frutos. Los tratamientos se aplican de 10 a 25 veces por estación de cultivo (Jeffries *et al.*, 1990; Kuo, 2001).

Tratamientos Poscosecha

Estos tratamientos cobran mayor importancia cuando los frutos se exportan ya que es necesario controlar la enfermedad durante el transporte y el almacenamiento durante el período de maduración. Un tratamiento muy utilizado son las inmersiones en agua caliente con fungicidas a concentraciones de 400 a 1000 ppm, en las cuales es importante cuidar que la temperatura sea lo suficientemente alta para destruir al patógeno sin causar daño al fruto. Los fungicidas más utilizados en poscosecha para *Colletotrichum*, son benomilo y procloraz (Eckert y Ogawa, 1985; Jeffries *et al.*, 1990). Se han utilizado también irradiaciones gama para el control de la antracnosis en mango, pero en las pruebas realizadas se concluyó que es necesario aplicar un baño caliente con fungicidas para mejorar el control logrado por la irradiación por sí sola (Jeffries *et al.*, 1990).

Actualmente se requiere buscar alternativas a estos compuestos, ya que la utilización de mancozeb está en revisión, debido a la toxicidad de su metabolito

etilenetiourea (Lentza-Rizos,1990). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos canceló el registro de benomilo en el año 2002 (EPA, 2002), además este fungicida había perdido su efectividad debido al surgimiento de cepas resistentes. Se ha demostrado que procloraz causa efectos antiandrogénicos en ratas (Vingaard *et al.* 2002) y además existe posibilidad de que se desarrollen cepas resistentes (Guzmán, 1998). Los compuestos de cobre sólo son efectivos en combinación con los fungicidas mencionados (Jeffries *et al.*, 1990). Una de las alternativas es la utilización de compuestos naturales antifúngicos obtenidos de plantas silvestres, que generalmente son más seguros para el ambiente que los fungicidas sintéticos (Wilson *et al.*, 1997; Meepagala *et al.*, 2002). En esta línea de investigación han sido estudiadas varias especies para el control de *C. gloeosporioides in vitro* (March *et al.*, 1991; Bommarito *et al.* 1998; Kobaisy *et al.*, 2001; Meepagala *et al.*, 2002; Oliva *et al.*, 2003).

Compuestos Fungicidas en Plantas

Las plantas superiores producen metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas. Estos compuestos están asociados a varios procesos como son la polinización, competencia con otras plantas y protección contra herbívoros y patógenos (Dominguez, 1973). Se ha demostrado que muchas plantas contienen compuestos de bajo peso molecular que inhiben el crecimiento de los hongos *in vitro*. Estos compuestos pueden estar presentes en extractos de plantas saludables, es decir, ser compuestos antimicrobianos preformados llamados fitoanticipinas o inhibitinas, las cuales existen estructuralmente en las plantas para detener la invasión de diversas especies de hongos o encontrarse sólo en plantas que han sido afectadas por patógenos o por estrés, llamados en este caso fitoalexinas, que se producen en respuesta a la infección de patógenos más específicos por reacciones

bioquímicas rápidas como la hidrólisis enzimática (Osbourne, 1999; Montes-Belmont *et al.*, 2000).

Diversos trabajos han demostrado que un mismo compuesto químico puede actuar como inhibidora en una planta y como fitoalexina en otra. La tendencia actual es eliminar esta clasificación y se prefiere describir estos compuestos como metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular, aunque también se han descubierto macromoléculas antifúngicas como algunas proteínas que parecen tener una función importante en los sistemas de defensa de las plantas contra patógenos (Montes-Belmont *et al.*, 2000). Los compuestos antifúngicos de bajo peso molecular incluyen una diversidad de metabolitos secundarios como son fenoles, saponinas, glicósidos, ácidos cíclicos, sesquiterpenos, isoflavonoides y derivados de indol que contienen azufre entre otros (Duke, 1990; Osbourne, 1999).

Se han realizado numerosos estudios para investigar la presencia de compuestos con actividad fungicida en plantas superiores. Entre ellos podemos citar los de March *et al.* (1991) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de 22 plantas del Mediterráneo, 7 de las cuales mostraron actividad antifúngica. Pandey y Dubey (1994) investigaron la actividad fungicida *in vitro* de 30 especies de angiospermas contra fitopatógenos que afectan a las semillas en el cultivo de tomate, 14 especies inhibieron más del 80% del crecimiento de los hongos. Wilson *et al.* (1997) estudiaron extractos de plantas y aceites esenciales contra *Botrytis cinerea*, en este estudio se evaluaron 345 plantas de las cuales, 13 mostraron niveles altos de actividad fungicida.

En México, Montes-Belmont *et al.* (2002) han evaluado el potencial antifúngico de 206 especies de plantas contra 26 especies de hongos fitopatógenos, sus resultados indican que entre 32 y 51% de las plantas probadas interactúan con los hongos y la respuesta de los patógenos varía desde la estimulación biológica hasta

su total inhibición. Estos investigadores han pasado de las pruebas *in vitro* a las pruebas en campo, logrando resultados promisorios con extractos acuosos contra la roya del frijol, la cenicilla y el mildiú de la calabacita. En el laboratorio de Ecología Química de la Dirección de Ciencia de los Alimentos del CIAD, se han evaluado 31 especies de plantas silvestres del estado de Sonora contra 11 fitopatógenos, encontrando una actividad mayor al 50%, en 35% de las plantas ensayadas.

Baccharis glutinosa

El género *Baccharis* pertenece a la familia Asteraceae la cual incluye plantas que son fuente rica de varios tipos de compuestos biológicamente activos (Meepagala *et al.*, 2002). Este género incluye 400 especies nativas de las regiones tropicales y subtropicales de América. Algunas son utilizadas por sus propiedades medicinales, otras como ornamentales así como para el control de la erosión. Se han reportado metabolitos con actividad antitumoral, antimicrobiana e insecticida en especies de este género (Karrfalt y Olson, 1998).

Por sus actividades biológicas han sido investigadas entre otras especies: *B. crispa*, la cual se ha utilizado en Argentina como infusión para problemas digestivos, Bandoni *et al.* (1974) y Ceñal *et al.* (1997) han realizado estudios fitoquímicos de esta especie; Rahalison *et al.* (1996) aislaron e identificaron dos compuestos con actividad antifúngica de *B. pedunculata*; Tortoriello y Aguilar-Santamaría (1996) estudiaron la actividad espasmolítica de *B. serraefolia*, utilizada en México para tratar la diarrea y Abad *et al.*, (1999) reportan actividad antiviral en *B. trinervis* y *B. teindalensis*

B. glutinosa Pers (= *B. salicifolia* Ruiz y Pavón) es una planta ampliamente distribuida en el norte de México y sur de Estados Unidos. Es un arbusto erecto y

abiertamente ramificado de 1.5 a 4 m de altura, con hojas alternas, simples, lanceoladas, de color verde brillante, con márgenes en ocasiones lisos pero generalmente aserrados, resinosas y de olor agradable; flores en cabezuelas de color blanco (figura 3). Crece cerca de arroyos, ríos o canales de riego, su nombre común en México es batamote (DiSalvo, 1974; Roja y Weidauer, 2002) y en Estados Unidos se conoce como "mulefat" o "sweepwillow". En la medicina tradicional ha sido utilizada para el dolor de oído, epilepsia, crecimiento del cabello, alopecia, seborrea (Roja y Weidauer, 2002), pie de atleta (DiSalvo, 1974), inflamaciones y aplicaciones en heridas y ampollas (Rahalison *et al.*, 1996).

En la revisión de literatura se encontraron pocos trabajos sobre la composición química y su relación con la actividad biológica de *B. glutinosa*. Di Salvo (1974) reporta actividad antifúngica de extractos hidroalcohólicos y acuosos de esta especie contra cuatro especies de dermatofitos. Verástegui *et al.* (1996) demostraron la actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto hidroalcohólico con varias especies de bacterias patógenas y dermatofitos. Campas (1996) evaluó la actividad antifúngica de extractos acuosos contra un fitopatógeno de la calabacita y realizó un análisis fitoquímico en el que se demostró la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, esteroides insaturados, ácidos orgánicos y fenoles. Corrales y López (2001), evaluaron la actividad de extractos etanólicos y metanólicos de varias plantas de la región, en esta investigación *B. glutinosa* inhibió el crecimiento de seis hongos fitopatógenos, en un rango del 15.4 a 100%. En ninguno de estos trabajos se aislaron los compuestos responsables de las actividades señaladas. En el estudio realizado por Araujo (1997), los extractos diclorometánico y metanólico obtenidos de esta especie, no mostraron actividad antifúngica ni aflatoxigénica, al evaluarlos con *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.



Figura 3. *Baccharis glutinosa* Pers. (= *B. salicifolia* Ruiz y Pavón).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Plantas

Se colectaron partes aéreas de *Baccharis glutinosa* en el Km 35 de la carretera Ures-Hermosillo a orillas del Río Sonora en el lugar conocido como "El Gavilán", en el mes de diciembre de 1999. El material se colocó en bolsas de papel para su traslado al laboratorio de Ecología Química del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Obtención de Extractos

Extracto Hidroalcohólico

La extracción se realizó mediante un proceso de maceración, utilizando 300 g de planta fresca en 3 litros de etanol/agua en una proporción de 7:3 (v:v), durante tres semanas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, el macerado se filtró primero con gasa, para quitar los sólidos grandes y posteriormente con papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se evaporó en un rotavapor Labconco a una temperatura de 50 °C a presión reducida y se llevó a sequedad en baño María a 50 °C y con flujo de Nitrógeno. Una vez seco, el extracto se pesó para determinar su rendimiento. Esta metodología es la reportada por Reyes (1995).

Extractos Diclorometánico y Metanólico

Se utilizaron 110 g de planta seca y triturada para su extracción con diclorometano (DCM) en sistema soxhlet, a 40 °C, durante 9 horas

aproximadamente, tiempo al cual el solvente de extracción se observó sin coloración. El mismo material vegetal se secó a temperatura ambiente para su extracción en soxhlet con Metanol (MeOH) a 50 °C durante 8 horas de acuerdo a la metodología utilizada por Cuiñat *et al.* (1990)

Para eliminar agua se agregó Cloruro de Calcio (CaCl_2) al extracto obtenido con DCM y Sulfato de Sodio (Na_2SO_4) al obtenido con MeOH; se guardaron en la oscuridad durante tres semanas y posteriormente se filtraron con papel filtro Whatman No. 5 y se evaporaron en rotavapor a 40 °C y 50 °C respectivamente. Se llevaron a sequedad en baño María a las mismas temperaturas y con flujo de Nitrógeno. Al igual que el extracto hidroalcohólico, estos extractos se pesaron para determinar su rendimiento.

Evaluación de la Actividad Antifúngica

Mantenimiento del Fitopatógeno

La cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* que se utilizó en el presente trabajo es la CECT 2859, de la Colección Española de Cultivos Tipo. (Valencia, España), aislada originalmente de frutos de *Citrus sinensis*. La metodología para su mantenimiento es la que se utiliza en el laboratorio de Ecología Química de CIAD, la cual consiste en conservar al microorganismo en tubos con agar papa dextrosa (APD) y aceite mineral, a 4 °C. Para utilizarse en los bioensayos de actividad antifúngica, se tomó micelio con un asa microbiológica y se sembró por estrias en 5 mL de APD solidificado, en placas Petri de 5 cm de diámetro y se incubó a 28 °C. En estas condiciones *C. gloeosporioides* alcanzó un crecimiento del 100% en seis días. A partir de este cultivo en placa, se

continuó resembrando el hongo cada 8 días, con el fin de mantener la cepa viable para los bioensayos.

Bioensayos de Actividad Antifúngica

Se evaluó la actividad antifúngica de los tres extractos obtenidos de *B. glutinosa*, utilizando el método de inoculación central (March *et al.*, 1991), el cual consiste en determinar la inhibición del crecimiento del hongo en el medio de cultivo APD adicionado con el extracto a probar, con respecto a un cultivo control el cual no contiene extracto.

Los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico, se evaluaron a una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se incorporaron al medio de cultivo disueltos en acetona/agua 1:1, acetona y acetona/agua 2:1.5, respectivamente. Se sembró el hongo por picadura central y se incubó a 28°C durante seis días. El ensayo se realizó por triplicado y el control consistió en la inoculación del hongo en el medio de cultivo con el solvente correspondiente, sin el extracto. Los resultados de actividad antifúngica se determinaron como porcentaje del crecimiento micelial de la muestra con respecto al crecimiento en el control.

Esta metodología se utilizó también para la evaluación antifúngica de las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de purificación, variando sólo las concentraciones. Las fracciones provenientes de las cromatografías de adsorción se evaluaron a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ y las fracciones provenientes de la cromatografía líquida de alta resolución a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. El compuesto activo identificado se evaluó a 25, 50 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para determinar su concentración mínima inhibitoria, utilizando el fungicida benomilo como control positivo.

Aislamiento Biodirigido de Compuestos Activos

Con base en los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica se eligió al extracto diclorometánico para el aislamiento de compuestos. En las pruebas de solubilidad se observó que al agregar acetona se formaba un precipitado, por lo que se decidió realizar una primera separación con este solvente. Se utilizaron 700 mL de acetona para la separación de 22 gramos de extracto. Para obtener una mejor separación, el sobrenadante y el precipitado se colocaron en tubos de polipropileno de 50 ml y se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto, a una temperatura de 5 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró en papel Whatman No. 5 y se llevó a sequedad en el rotavapor a 45 °C y a presión reducida.

Al precipitado obtenido con acetona se le llamó fracción precipitada con acetona (FPA) y al sobrenadante, fracción soluble en acetona (FSA). Para el aislamiento de los compuestos activos se utilizaron las técnicas de cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en columna de sílica gel 60 y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Cromatografía en Capa Fina

Esta técnica se utilizó como primer análisis de cada una de las fracciones activas, con el fin de determinar su complejidad y la movilidad de sus componentes con diferentes solventes y mezclas de éstos para seleccionar el sistema de elución y fase estacionaria a emplear en la CCA y HPLC.

Se utilizaron cromatofolios plásticos recubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck para cromatografía en fase directa, 5 x 10 cm así como placas de vidrio con las mismas dimensiones, recubiertas con gel de sílice C-18 para fase reversa. Las muestras disueltas en acetona se eluyeron con Hexano (Hex), Diclorometano (DCM), Acetato de Etilo (AE), Tetrahidrofurano (THF), Etanol (EtOH), Acetona (AC), Metanol (MeOH) y mezclas de éstos para fase directa y con Acetonitrilo (AN), Metanol (MeOH), agua (H₂O) y mezclas de éstos, en fase reversa. La movilidad de los componentes se observó bajo una lámpara de luz ultravioleta a longitudes de onda de 254 y 366 nm.

Cromatografía en Columna de Sílica Gel 60

Se utilizó como fase móvil Hex/AE en diferentes concentraciones, AE y MeOH. En esta etapa se emplearon dos columnas de vidrio: una de 120 x 2.5 cm (Kontex, serie k-420870) y otra de 60 x 1.9 cm así como una bomba peristáltica (Haake Buchler) para establecer flujos de 0.6 a 1 mL/min. Se colectó por volumen, de 5 a 15 mL por tubo, con un colector automático (Cygnet, ISCO) con carrete de tubos 18 x 150.

Después de cada separación se obtuvieron los espectros de absorción, a longitudes de onda de 220 a 700 nm, del contenido de cada uno de los tubos, en un espectrómetro de barrido CARY 13-E Varian y se agruparon en fracciones los que presentaron espectros similares. Se realizaron los ensayos de actividad antifúngica para evaluar cada fracción.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para el aislamiento de los compuestos activos se realizaron separaciones por HPLC, en un cromatógrafo Waters 600 E, acoplado a un detector UV-Vis Hewlett Packard serie 1100 con arreglo de fotodiodos así como en un cromatógrafo HPLC serie 1100 con un detector UV-Varian serie 9050; con los dos equipos se utilizó además un detector de índice de refracción HP 1047A.

En las corridas analíticas se utilizaron las columnas Licrosphere de sílice 60 e Hipersyl ODS C-18, ambas de 250 x 4 mm, aplicando 0.1 mg de muestra, con un flujo de 0.5 mL/min. En las corridas semipreparativas se utilizaron las columnas Nucleosil de gel de sílice 60 y Licrosphere C-18, de 250 x 100 mm, se aplicaron 6 mg de muestra como máximo, con un flujo de 1 a 2 mL/min. Como fase móvil se utilizó DCM/AE 97:3 y HEX/AE 70:30 en fase directa y para fase reversa MeOH y MeOH/ H₂O 75:25

Identificación de Compuestos Aislados

Los análisis espectroscópicos para la caracterización de la estructura química del compuesto activo se realizaron en el Instituto de Tecnología Química de la Universidad Politécnica de Valencia, España, utilizando las siguientes técnicas espectroscópicas.

- Espectrometría de resonancia magnética nuclear. La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃), utilizando tetrametilsilano como referencia interna. Los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN se obtuvieron en un equipo Varian de 400 MHz.

- Espectrometría de masas (EM). Para este análisis se utilizó un espectrómetro Hewlet-Packard 5988 A, con una emisión de 70 eV.
- Espectroscopia de Infrarrojo. El equipo utilizado fue un espectrómetro Perkin-Elmer 781 con pastilla de bromuro de potasio (KBr)

Los espectros obtenidos se compararon con los reportados en la literatura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los Extractos

Los rendimientos de los extractos obtenidos de *B. glutinosa* fueron los siguientes: por maceración con etanol/agua 70:30, se obtuvieron 36.2 g de extracto a partir de 300 g de planta fresca dando un rendimiento del 12%, en soxhlet con diclorometano se obtuvieron 21.2 g de extracto utilizando 105 g de planta seca y con metanol se recuperaron 7.8 g de extracto de 55 g de planta seca lo que corresponde a rendimientos del 20.2% y 14.3% respectivamente. (figura 4)

Araujo (1997) trabajó con extractos de *B. glutinosa* obteniendo rendimientos del 8.29% con diclorometano y 26.81% con metanol. Respecto a otras especies del mismo género, Rahalison *et al.* (1996) obtuvieron 18 g de extracto diclorometánico a partir de 250 g de hojas secas de *B. pedunculata* lo cual corresponde a un rendimiento del 7.2%. Ceñal *et al.* (1997) obtuvieron 550 g de extracto metanólico utilizando 3 Kg de hojas secas de *B. crispera*, dando un rendimiento de 18.3%. Sin embargo los resultados no pueden ser comparados ya que la proporción de compuestos químicos puede variar dependiendo de la especie, localidad y clima, además de algunas diferencias en la metodología de extracción utilizada en los trabajos mencionados y el presente.

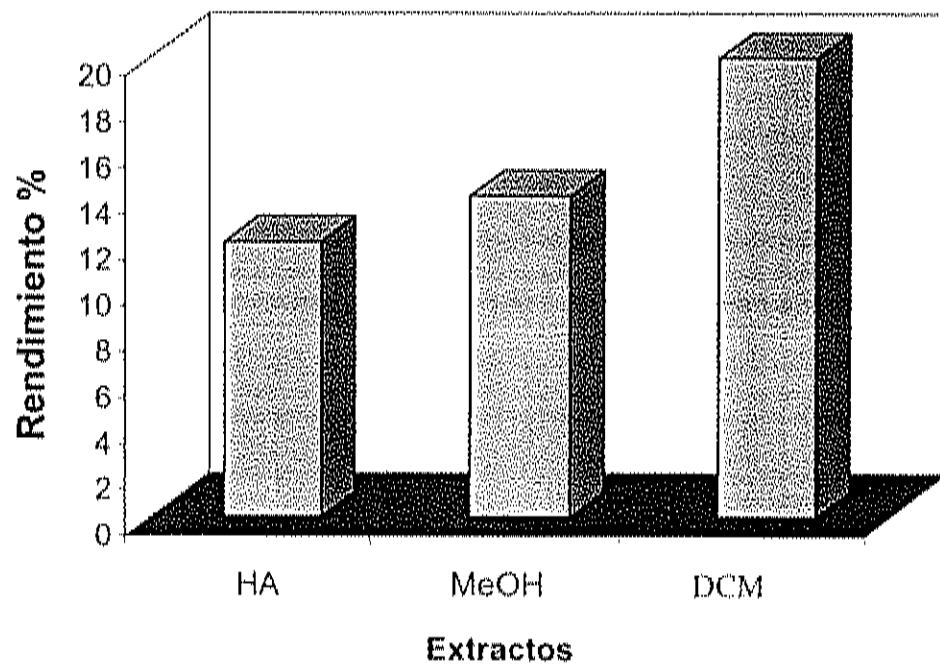


Figura 4. Rendimiento de los extractos hidroalcohólico, metanólico y diclorometánico, obtenidos de *B. glutinosa*.

Evaluación de la Actividad Antifúngica

Los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas y ramas tiernas de *B. glutinosa* se presentan en la figura 5. El extracto obtenido con diclorometano inhibió en un 100% el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, los extractos metanólico e hidroalcohólico no mostraron ningún efecto en el desarrollo del hongo.

Son pocos los trabajos publicados, relacionados con la composición química y actividad biológica de *B. glutinosa*. Con esta especie, DiSalvo (1974) realizó un estudio para evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana de tres extractos obtenidos con alcohol al 70%, alcohol al 95% y agua. Comparó la actividad en hojas, tallos y semillas, encontrando una mayor actividad en las hojas, no hubo diferencia en la actividad mostrada entre los tres extractos. Los microorganismos que presentaron inhibición en su crecimiento fueron los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum audouinii*, a diluciones entre 1:16 y 1:128. Sin embargo no inhibió el desarrollo de levaduras, bacterias y hongos sistémicos. Al igual que estos últimos, *C. gloeosporioides* no presentó inhibición con el extracto hidroalcohólico al 70%, obtenido en el presente trabajo.

Verástegui *et al.* (1996) evaluaron la actividad de un extracto obtenido con alcohol al 80%, sus resultados muestran inhibición en el desarrollo de tres de las once bacterias patógenas ensayadas: *Clostridium perfringens*, *Listeria monocitogenes*, *Proteus vulgaris* y en cinco de los once hongos: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Sporotrix schenkii*, *Trichophyton tonsurans* y *Epidermophyton floccosum*, confirmando los resultados obtenidos por DiSalvo

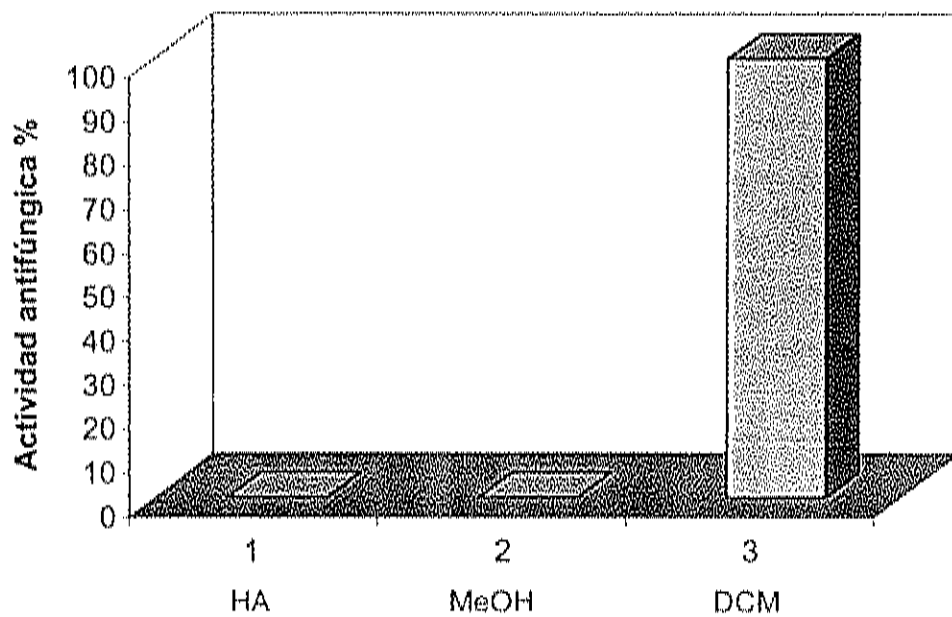


Figura 5. Actividad antifúngica, de los extractos obtenidos de *B. glutinosa* evaluados a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, contra *C. gloeosporioides*.

(1974) con los dos últimos hongos mencionados.

Utilizando un extracto acuoso de *B. glutinosa* Campas (1996) evaluó su actividad *in vivo* contra el agente causal de la cenicilla de la calabacita, *Erysiphe cichoracearum* en condiciones de invernadero. El análisis fitoquímico indicó que el extracto contiene compuestos alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, esteroides insaturados, ácidos orgánicos y fenoles pero no aisló los compuestos para determinar cuál o cuáles compuestos son responsables de la actividad. En el estudio realizado por Araujo (1997) los extractos obtenidos con DCM y MeOH, no presentaron actividad antifúngica ni aflatoxigénica contra *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

No se encontraron reportes en los que se haya evaluado el efecto de extractos de *B. glutinosa* sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Sin embargo, en la búsqueda de compuestos naturales para el control de este hongo, se han realizado investigaciones con otras plantas: March *et al.* (1990), evaluaron la actividad de extractos obtenidos con DCM y MeOH de 22 plantas de la costa del Mediterráneo; fracciones de los extractos DCM de *Inula dysenterica* y *Bides pilosa* mostraron una actividad >90% y entre 60 y 90% respectivamente. No presentaron actividad contra este hongo los extractos metanólicos de las mismas plantas. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, indicando que los extractos activos de *I. dysenterica* y *B. pilosa* son de una polaridad similar a la del extracto activo de *B. glutinosa*, cabe mencionar que las tres especies pertenecen a la familia Compositae, actualmente llamada Asteraceae, la cual incluye plantas que son fuente rica de varios tipos de compuestos biológicamente activos (Meepagala *et al.*, 2002)

Algunos extractos de plantas han mostrado un amplio espectro de actividad sobre diferentes hongos, lo cual puede deberse a que algunos compuestos actúan en distintos sitios de la membrana plasmática (Montes-Belmont, 2000). Por esto, el número de fitopatógenos diferentes que puede inhibir un extracto depende de su forma de interactuar con el microorganismo. En un trabajo de Vargas y Vallejo (datos no publicados), los extractos de *B. glutinosa* mostraron actividad antifúngica contra tres de seis especies de fitopatógenos: *Fusarium sp.*, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, pero su actividad fue menor al 40%, por lo que no se le considera una buena fuente para el control de estos hongos. Al comparar los resultados de la evaluación de la actividad de los extractos de esta especie con los obtenidos con *Larrea tridentata* y *Datura stramonium* en el mismo trabajo, se observa que *B. glutinosa* presenta un espectro de actividad más reducido.

Por otra parte, algunos hongos son muy susceptibles a una gran cantidad de plantas, debido a que los procesos bioquímicos presentes en la germinación de esporas pueden ser inhibidos por diferentes metabolitos secundarios, ejemplos de este tipo de hongos son *Alternaria porri* y *Puccinia sorghy* (Montes-Belmont *et al.*, 2000). Otros hongos son resistentes a una gran variedad de extractos, debido a que posiblemente dispongan de mecanismos enzimáticos que impidan la acción de los metabolitos. En este aspecto, se puede señalar que *C. gloeosporioides* mostró resistencia a 42 de 54 extractos de plantas nativas del estado de Sonora y presentó sólo inhibición parcial con extractos de *Datura stramonium*, *Larrea tridentata* y *Proboscidea parviflora* en el estudio exploratorio previo al presente trabajo. Datos que sugieren que *C. gloeosporioides* contiene mecanismos para la degradación de los compuestos antifúngicos de algunas plantas.

Aislamiento Biodirigido de Compuestos Activos

Al realizar las pruebas de solubilidad con acetona del extracto DCM, se formó un precipitado, el cual se separó por centrifugación y filtrado en papel para evaluar la actividad antifúngica de las fracciones soluble y no soluble en este solvente. La fracción soluble (FSA) inhibió totalmente el crecimiento del hongo, mientras que el precipitado (FPA) no presentó actividad.

Con base en los resultados obtenidos en CCF, se procedió a realizar la separación de la FSA del extracto DCM por cromatografía de adsorción en sílica gel 60. Se aplicaron 7 gramos de muestra, se colectaron 132 tubos de 15 mL cada uno y el lavado con metanol. Las fracciones colectadas se agruparon en 12 fracciones de acuerdo a la similitud presentada en sus espectros de absorción UV-VIS. Las fracciones 1 a 6 eluyeron con Hex/AE 60:40, la F7 y la F8 con Hex/AE 50:50, de la F9 a F11 con AE 100% y la F12 correspondió al lavado con MeOH. Cada una de las fracciones se evaporó a sequedad, y se almacenaron en atmósfera de nitrógeno a -20 °C para su evaluación posterior.

La actividad de estas fracciones se evaluó a 300 µg mL⁻¹, la reducción de la concentración respecto a la utilizada con los extractos completos se basa en el criterio de que los compuestos responsables de la actividad se encuentran en una mayor concentración a medida que se avanza en el proceso de purificación. Los resultados de esta evaluación se presentan en la figura 6. Las fracciones FSA-3 y FSA-4 inhibieron en un 100% el desarrollo de *C. gloeosporioides* y la FSA-5 lo inhibió sólo en un 10%. Las cantidades recuperadas de las fracciones cien por ciento activas fueron 3.21 g y 1.12 g respectivamente.

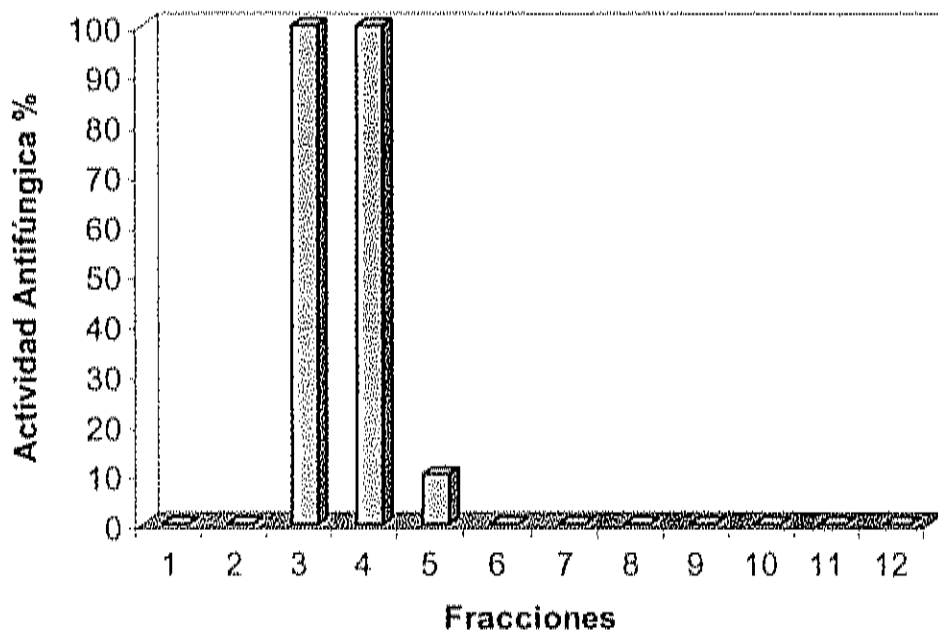


Figura 6. Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas de la fracción soluble en acetona (FSA) por cromatografía en sílica gel 60, evaluadas a una concentración de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. gloeosporioides*.

Como se describió en el Capítulo de Materiales y Métodos, en todas las separaciones por cromatografía de adsorción, las fracciones se integraron utilizando sus espectros de absorción. Asimismo, cada fracción obtenida tanto por CCA como por HPLC se analizó en CCF para determinar su complejidad así como para elegir la fase móvil a utilizar para la siguiente separación hasta llegar al aislamiento.

Análisis de la Fracción FSA-3

Cromatografía en sílica gel 60. En la separación de la FSA-3 se aplicaron 3 g de muestra, se colectaron 151 tubos de 5 mL cada uno y un litro del lavado con MeOH, los cuales se agruparon en 12 fracciones. Las fracciones 1 a 10 eluyeron con Hex/AE 60:40, la F11 con AE 100% y la F12 correspondió al lavado con MeOH. Los resultados del bioensayo de actividad antifúngica se presenta en la figura 7. Las fracciones 6, 7 y 8, inhibieron en un 100% el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Con base en los resultados obtenidos en el análisis de CCF de estas fracciones, se decidió integrarlas en una sola FSA-3-(6+7+8), debido a que parte de las bandas observadas se presentaron en las tres fracciones y se le denominó FSA-3-6.

En la siguiente separación se aplicaron 1.1 g de la FSA-3-6, se colectaron 44 tubos de 5 mL cada uno y se agruparon en 6 fracciones. Las fracciones 1 a 4 eluyeron con Hex/AE 80:20, la F5 con AE y la F6 corresponde al lavado con MeOH. En la figura 8 se presentan los resultados del bioensayo de actividad antifúngica de estas fracciones. Como se puede observar las fracciones FSA-3-6-2 y FSA-3-6-3, mostraron una actividad del 100%, mientras

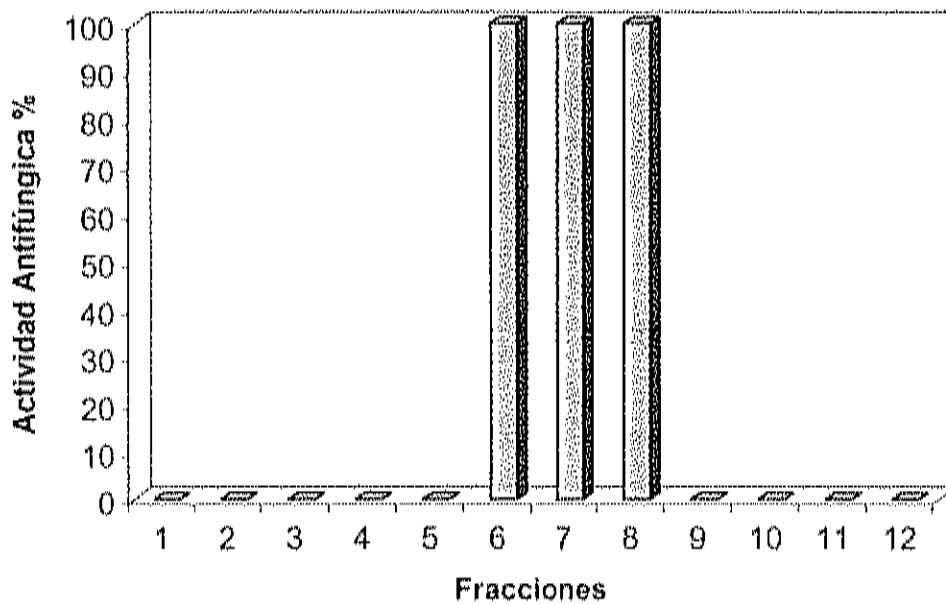


Figura 7. Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas de FSA-3 por cromatografía en sílica gel 60 evaluadas a una concentración de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. gloeosporioides*.

que la FSA-3-6-4 y FSA-3-6-5 inhibieron en un 26% y 23% respectivamente el desarrollo de *C. gloeosporioides*.

Cromatografía líquida de alta resolución. Se continuó con el aislamiento de los compuestos presentes en la FSA-3-6-2 por HPLC con el fin de lograr la purificación del compuesto activo. Utilizando DCM/AE 97:3 como fase móvil se obtuvo el cromatograma que se presenta en la figura 9. Se separaron cinco fracciones las cuales se sometieron al ensayo de evaluación antifúngica a una concentración de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. De estas fracciones, la F4-HPLC1 resultó ser la fracción activa y las otras cuatro no mostraron ningún efecto. Su espectro de absorbancia a 254 nm indica que no es un compuesto único. Se analizó por CCF, observándose tres bandas con Hex/AE 70:30. Por esta razón se sometió a otra cromatografía por HPLC para su purificación. Con esta fase móvil se separaron 5 fracciones (figura 10), en la evaluación antifúngica la fracción F3-HPLC2 mostró 100% de actividad, las otras fracciones no mostraron ningún efecto. Como puede observarse en la figura 10, con estas condiciones de separación su espectro indica que se trata de más de un compuesto.

Purificación del producto 1. Utilizando Hex/AE 70:30 como fase móvil se separó la F3-HPLC2 en dos fracciones como se señala en la figura 11. Se evaluó la actividad antifúngica de cada una a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. La fracción activa F2-HPLC3 corresponde al segundo pico, este compuesto es un polvo de color gris claro, con absorbancia máxima a 274 nm, al cual se le denominó producto 1. Debido a la poca cantidad recuperada no fue posible continuar con su identificación en el presente trabajo.

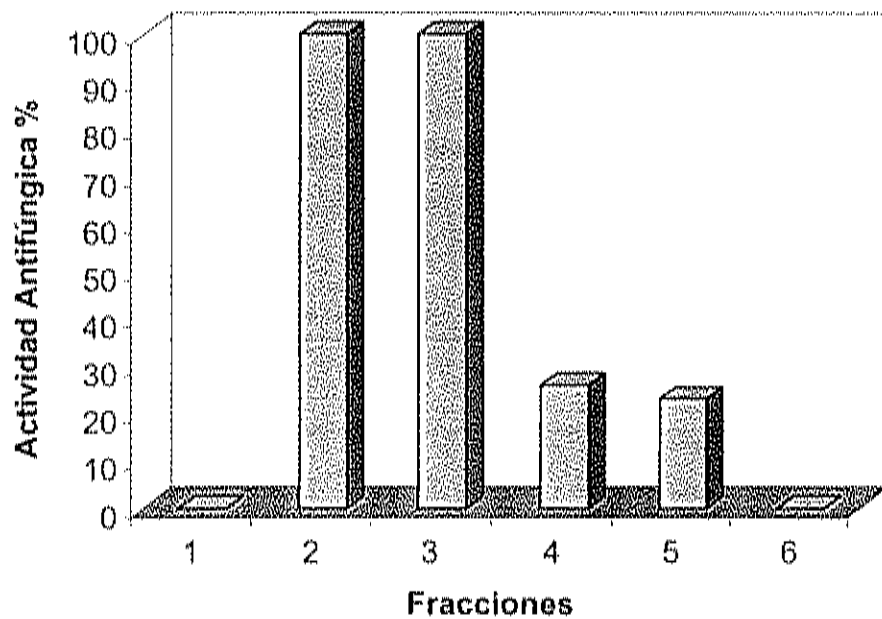


Figura 8. Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas de FSA-3-6 por cromatografía en sílica gel 60 evaluadas a una concentración de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. gloeosporioides*.

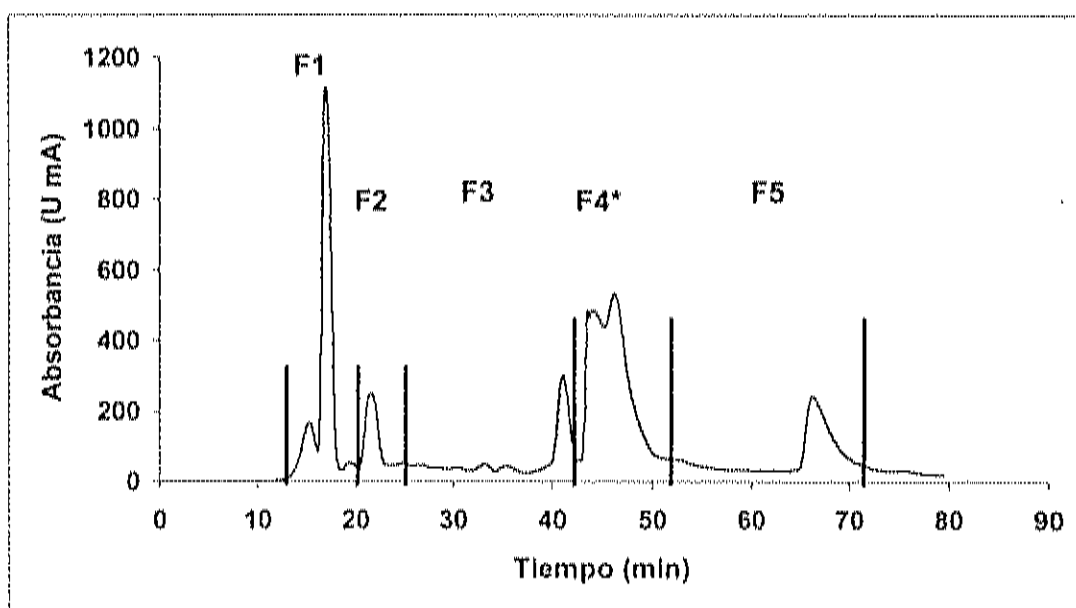


Figura 9. Cromatograma HPLC de la fracción FSA-3-6-2.
(*Fracción activa).

Condiciones de corrida:

Columna semipreparativa Nucleosil sílica 60

Fase móvil: DCM/AE 97:3

Flujo: 1mL/min

Detector DAD a 254 nm

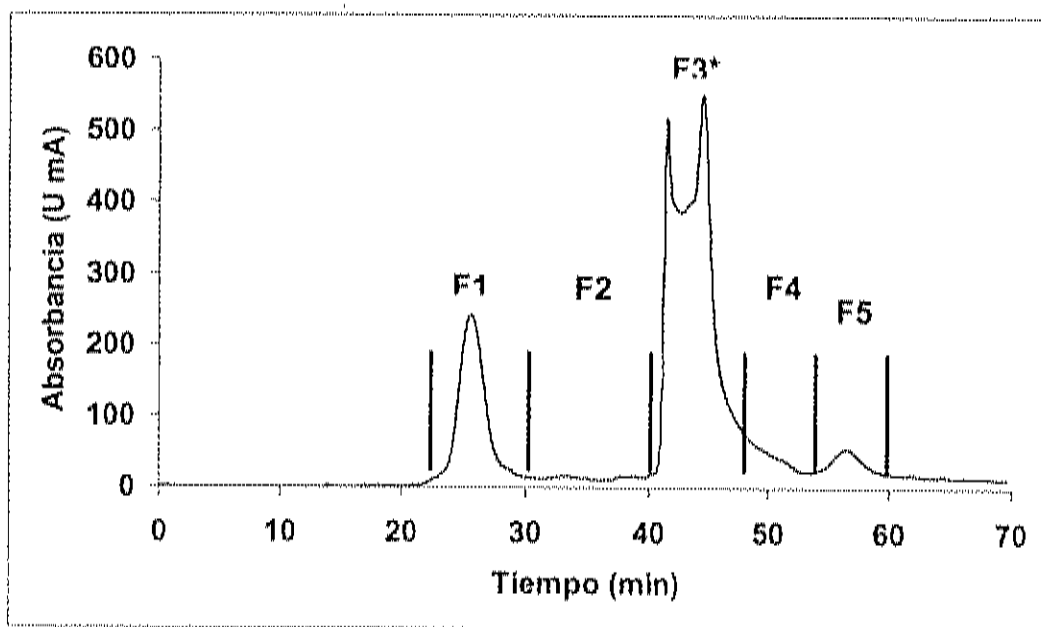


Figura 10. Cromatograma HPLC de la fracción F4-HPLC1.
(*Fracción activa)

Condiciones de corrida:

Columna semipreparativa Nucleosil silica 60

Fase móvil: Hex/AE 70:30

Flujo 0.5 mL/min

Detector DAD a 254 nm

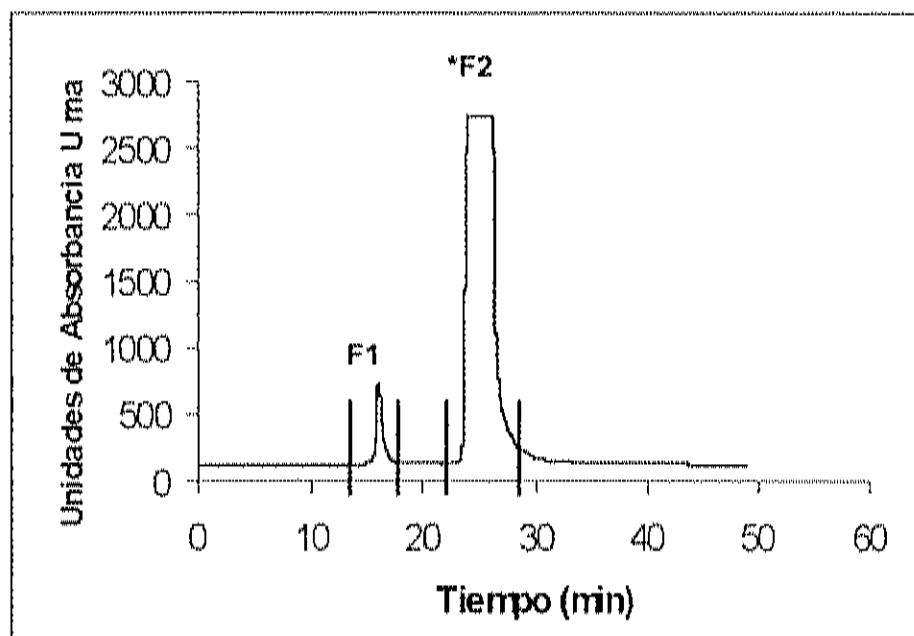


Figura 11. Cromatograma HPLC de la Fracción F3 HPLC2.
(*Producto 1)

Condiciones de corrida:

Columna semipreparativa Nucleosil silica 60

Fase móvil: Hex/AE 70:30

Flujo: 1 mL/min

Detector DAD a 254 nm

Análisis de la Fracción FSA-4

Cromatografía en sílica gel 60. Se aplicaron 800 mg de FSA-4, se colectaron 55 tubos de 10 mL cada uno, y 500 mL del lavado con MeOH., los cuales se agruparon en 5 fracciones. Las fracciones 1 y 2 eluyeron con Hex/AE 80:20, la F3 y F4 con AE y la F5 correspondió al lavado con MeOH. Sólo la FSA-4-3 mostró actividad antifúngica, inhibiendo en un 100% el crecimiento del hongo.

Con base en los resultados de CCF, se decidió realizar otra cromatografía en sílica gel 60. En esta segunda separación, se colectaron 40 tubos de 5 mL cada uno, los cuales se agruparon en 9 fracciones. Las fracciones 1 a 7 eluyeron con Hex/AE 50:50, la 8 con AE y la 9 con MeOH. La fracción FSA-4-3-6 inhibió en un 100% el desarrollo del hongo.

Cromatografía líquida de alta resolución. Se procedió a analizar la FSA-4-3-6 por HPLC en fase reversa utilizando MeOH como fase móvil. El cromatograma se presenta en la figura 12. Se aislaron 5 fracciones, de las cuales la fracción 2 mostró un 100% de actividad y las otras cuatro no mostraron ningún efecto. Como se observa en el cromatograma el espectro de absorción de esta fracción indica que no se trata de un solo compuesto, por lo que se procedió a continuar con su separación por HPLC.

Purificación e identificación del producto 2. Utilizando HPLC fase reversa y MeOH/H₂O 75:25 como fase móvil se logró separar el compuesto activo de F2-HPLC1, el cual al evaporar el solvente se presentó como agujas finas de color amarillo claro. A este compuesto se le denominó producto 2, del cual se

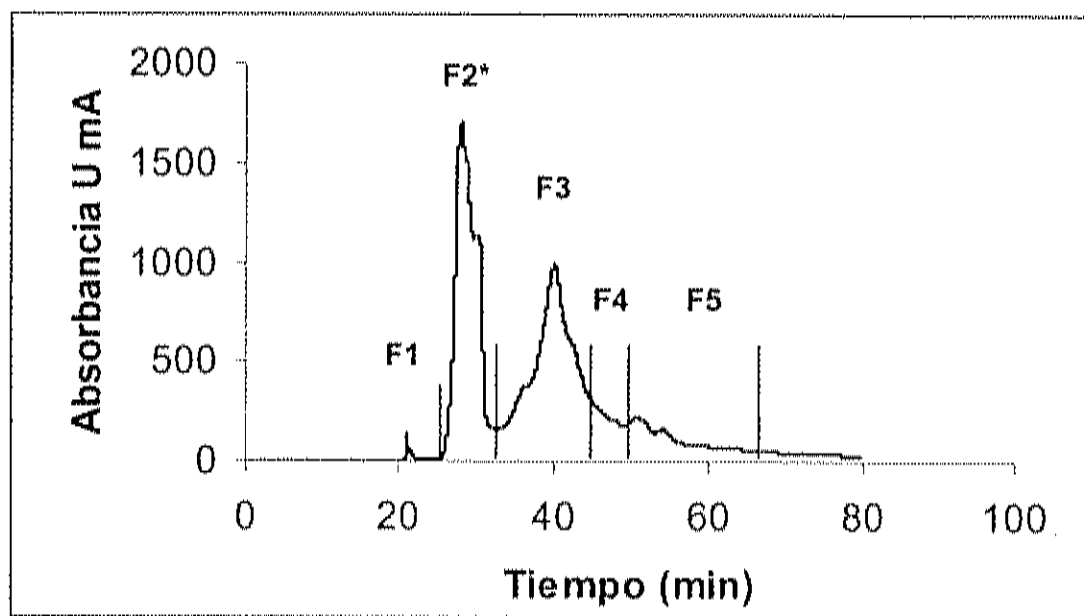


Figura 12. Cromatograma HPLC de la fracción FSA-4-3-6
(*Fracción activa)

Condiciones de corrida:

Columna semipreparativa Licosphere C18

Fase móvil: Metanol

Flujo: 1 mL/min

Detector DAD a 254 nm

obtuvieron sus espectros de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C , de masas e infrarrojo.

En el espectro de ^1H RMN (figura 13), destacan las señales con desplazamientos δ (ppm) de 7.724, 7.007, 6.985 y 6.758 (4 H) que corresponden a protones aromáticos y de 4.017, 3.976, 3.926, 3.871 que corresponden a protones metoxílicos (18 H), en total son 22 señales de los protones del compuesto. En el espectro de ^{13}C RMN (figura 14) destacan las señales δ (ppm) 56.074, 56.210, 56.385, 60.026, 61.627, 62.287 que corresponden a grupos metoxilos ($\text{O}-\text{CH}_3$) así como las de 141.027, 151.222 y 153.437 ppm correspondientes a carbonos aromáticos unidos a oxígeno y la señal a 173.842 que corresponde al grupo carbonilo.

El espectro de infrarrojo (figura 15) presenta una señal a ν_{max} 1620 cm^{-1} que confirma la presencia de un grupo $\text{C}=\text{O}$. Las señales 2780-2910 cm^{-1} corresponden a enlaces $\text{C}-\text{H}$ y las bandas 1218, 1267, 1358, 1431, 1463 y 1514 corresponden a grupos $\text{O}-\text{CH}_3$. En el espectro de masas (figura 16) obtenido por inserción directa, destacan los fragmentos m/z (intensidad relativa): 402 $[\text{M}^+]$ (33%), 401 (30%), 388 (19%), 387 (100%), 344 (10%) y 371 (9%).

Los datos espectroscópicos de este compuesto coinciden con los reportados para nobiletina, 5,6,7,8,3',4' hexametoxiflavona (El-Schafae, 2002), cuya fórmula condensada es $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$ (figura 17), la cual pertenece al grupo de las flavonas, que son compuestos fenólicos con una amplia distribución en la naturaleza y con varias actividades biológicas que son de interés desde el punto de vista ecológico así como por su potencial de aplicación farmacológica (Ortuño *et al.*, 1998).

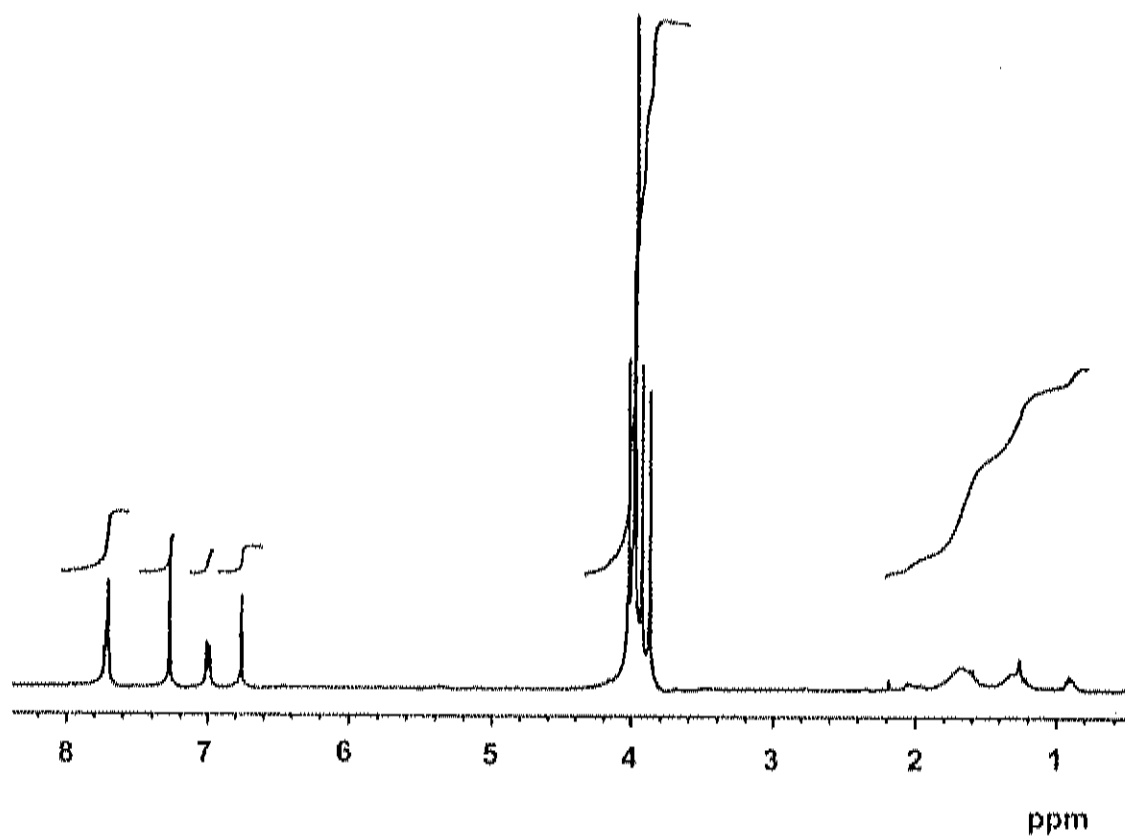


Figura 13. Espectro de ^1H RMN del compuesto 2,
Solubilizado en CDCl_3 . Frecuencia 400 MHz, temperatura ambiente.

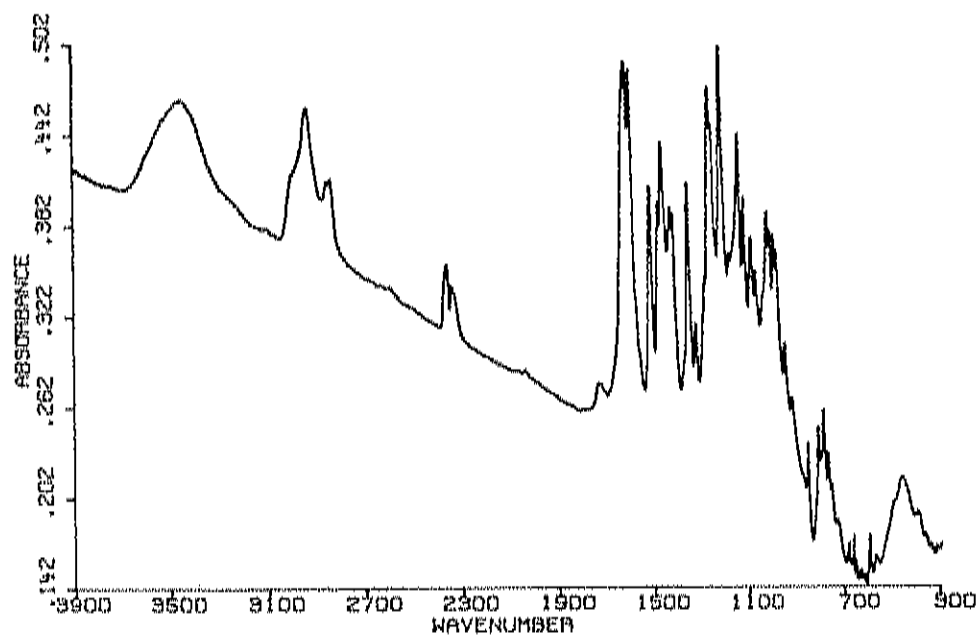


Figura 15. Espectro infrarrojo en pastilla de KBr del compuesto 2

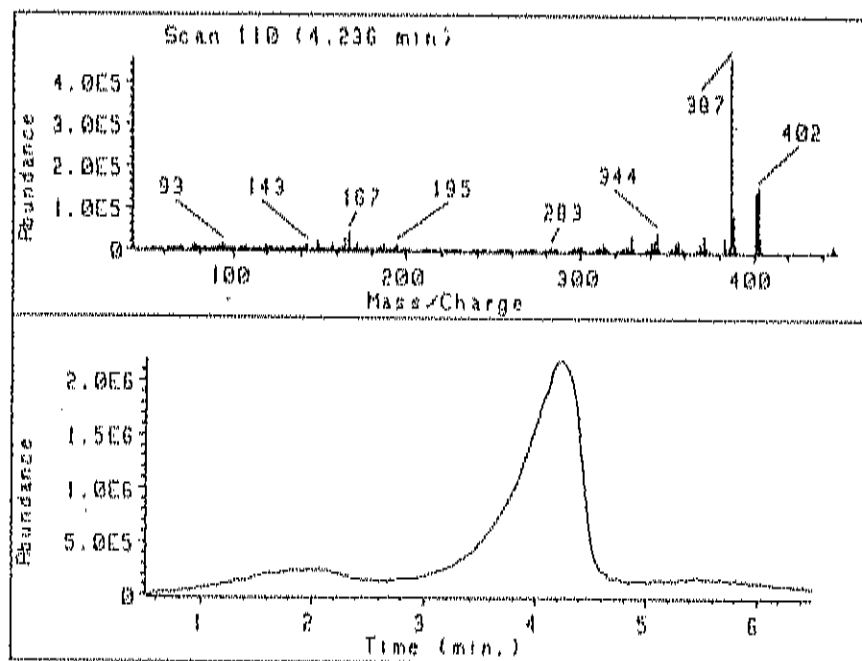


Figura 16. Espectro de masas del compuesto 2.

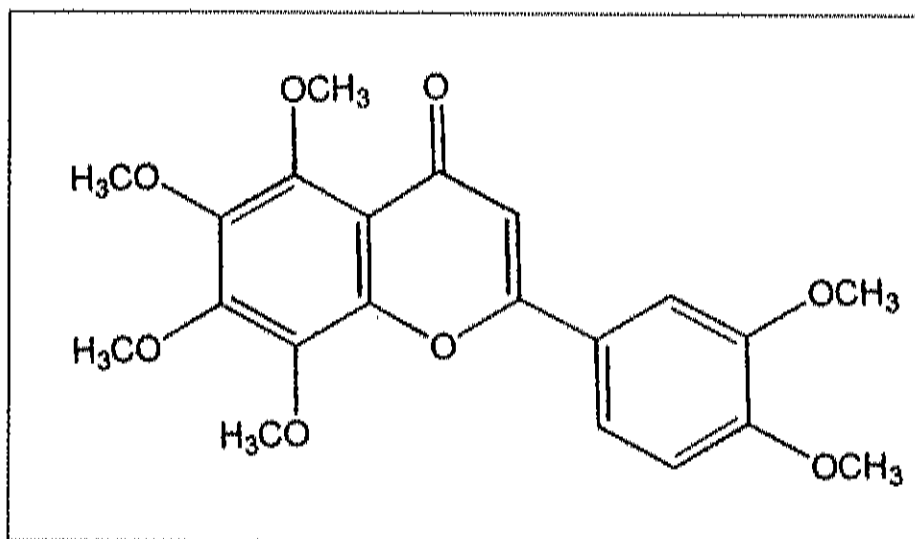


Figura 17. Nobiletina, 5,6,7,8,3',4' hexametoxiflavona

Con base en sus espectros de ^1H y ^{13}C se determinaron los patrones de metoxilación de la flavona, ya que no presenta resonancia de protones del anillo aromático A, indicando que los grupos metoxilos se encuentran en C-5, C-6 y C-8. Se ha reportado que la resonancia de los grupos metoxilos unidos a carbonos sustituidos di-orto, ocurren a campo bajo (~ 60 ppm) de las señales de los que se encuentran unidos a carbonos que no tienen sustituyentes en posición orto o sólo tienen uno, los cuales se presentan a ~ 55 ppm (Panichpol y Watwermen, 1978; Roitman y James, 1998). Estas características representan una herramienta muy útil de diagnóstico para el análisis estructural de las flavonas polimetoxiladas.

Se han aislado flavonas polimetoxiladas, de *Poporwia cauliflora* (Panichpol y Watwermen, 1978), *Gutierrezia microcephala* (Roitman y James, 1985), *Ageratum conyzoides* (Galati *et al.*, 2001) y han sido reportadas sus propiedades biológicas como compuestos anticancerígenos, antioxidantes y antiinflamatorios. Amaral *et al.* (2001) aislaron varias flavonas hidroxiladas y metoxiladas, entre ellas una flavona hexametoxilada 5,6,7,3',4',5', de *Ficus glomeriella*, planta que se utiliza en la medicina tradicional como laxante y vermífugo. Respecto a especies del género *Baccharis*, Bandoni *et al.* (1978) aislaron estos compuestos de *B. crispa*, de la cual se utilizan varias toneladas al año en la medicina tradicional y en productos farmacéuticos, Rahalison *et al.* (1995) reportan dos flavonas obtenidas de *B. pedunculata* con una baja actividad antimicrobiana.

Nobiletina, la hexametoxiflavona aislada de *B. glutinosa* en el presente trabajo, se ha obtenido de plantas de la familia Labiatae y de varias especies del género *Citrus*. Pinkas (1968) aisló de las hojas de mandarina cuatro flavonas con actividad fungicida entre ellas a nobiletina, que mostró actividad

contra *Deuterophoma tracheiphila* y *Fusarium moniliforme*. Ortuño *et al.* (1998) evaluaron la actividad antifúngica de varias flavonas polimetoxiladas, incluyendo la nobiletina, aisladas de aceites esenciales de toronja, naranja ácida, naranja dulce y limón, para el control de los fitopatógenos *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum* y *Geotrichum sp.*, obteniendo inhibiciones del crecimiento de los hongos en un rango del 8 al 100%. Se ha reportado esta flavona, como parte de los compuestos del ajo (Foster *et al.* 2001) pero en ese estudio, en el cual se confirmó la actividad inhibitoria del ajo sobre el citocromo humano P450 3A4 y sobre la P-glicoproteína, no se concluyó sobre los compuestos responsables de esta actividad.

Concentración Mínima Inhibitoria

Se evaluó la actividad antifúngica de la flavona a 25, 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para determinar su concentración mínima inhibitoria. Como control positivo se utilizó al fungicida benomilo, el cual ha sido uno de los tratamientos más efectivos en el control de *C. gloeosporioides* en el campo. Los resultados se presentan en la figura 18. Como se puede observar la actividad de la flavona es comparable a la del benomilo, a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inhibe el crecimiento de *C. gloeosporioides* en un 80%.

Pruebas con extractos etanólicos de hojas de *Azadirachta indica*, mostraron un nivel similar de inhibición en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides in vitro* que el obtenido con la flavona aislada en el presente trabajo (Bommarito *et al.*, 1998). A partir del anuncio de la EPA de la cancelación del registro de benomilo los trabajos relacionados con la búsqueda

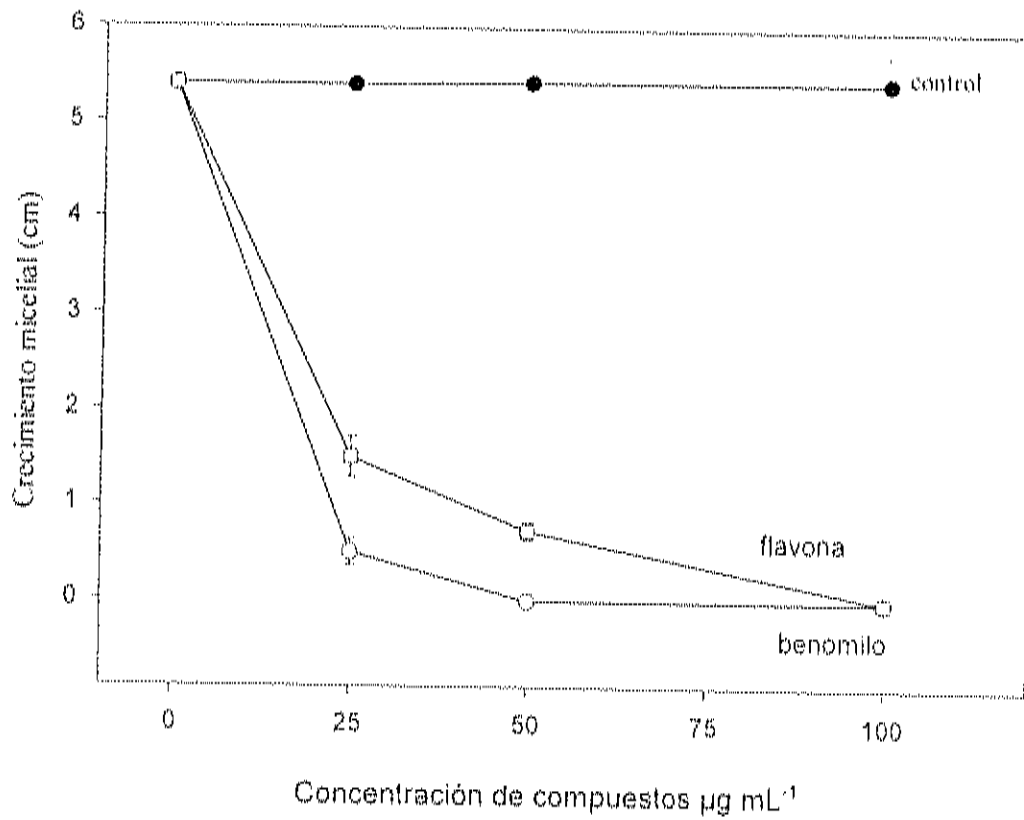


Figura 18. Evaluación de la actividad antifúngica de la hexametoxiflavona y benomilo a 25, 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$

de compuestos alternativos para el control de *C. gloeosporioides* se han incrementado. Kobaisy *et al.* (2001) evaluaron compuestos aislados de hojas del aceite esencial de *Hibiscus cannabinus*, 5-metilfurfural, acetaldehído bencénico y *n*-nonanal inhibieron el crecimiento de este fitopatógeno pero los autores señalan que la actividad presentada es débil por lo que estos compuestos no presentan perspectivas para utilizarse como una alternativa para el control de este fitopatógeno.

Otros trabajos incluyen al producto natural Zopfiellin, aislado del ascomiceto *Zopfiella curvata* que inhibió el crecimiento del hongo en un 100% a una concentración de 15 μM , en ese estudio se demostró además que la actividad antifúngica de este producto es dependiente del pH del medio (Futagawa *et al.*, 2002). Oliva *et al.* (2003) evaluaron la actividad de dos furanocumarinas, un alcaloide quinolina, cuatro alcaloides quinolonas, aislados de *Ruta graveolens*, el segundo compuesto inhibió en un 50% el desarrollo de *C. gloeosporioides* a 300 μM , pero fue menos efectivo que benomilo (66% a la misma concentración); el compuesto más activo fue una de las quinolonas produciendo una inhibición del 67.7% a 100 μM .

Meepagala *et al* (2002) aislaron tres compuestos del aceite esencial de *Artemisa dracunculus*, 5-fenil-1,3 pentadine, metileugenol y capilarina, los tres compuestos inhibieron el crecimiento de *C. gloeosporioides*, por lo que los autores sugieren que pueden tener potencial como fumigantes para hongos postcosecha debido a su naturaleza volátil. Meazza *et al.* (2003) evaluaron la actividad de naftoquinonas, benzoquinonas y antraquinonas provenientes de una colección de productos naturales, estos compuestos presentaron una actividad moderada contra *C. gloeosporioides* pero se concluye que se requirieron más estudios para determinar su uso potencial como agroquímicos.

La actividad antifúngica de nobiletina sobre *C. gloeosporioides* así como las mostradas por algunos de los compuestos naturales utilizados en los trabajos mencionados, son una aportación importante para el desarrollo de nuevos prototipos de agentes antifúngicos con formas de acción diferentes a las de los fungicidas tradicionales, para evitar problemas de resistencia cruzada con los compuestos actualmente utilizados.

Los mecanismos de acción de estos compuestos no se han establecido claramente. Los compuestos biológicamente activos como los fungicidas, deben pasar primero de su sitio de aplicación a su sitio de acción en el microorganismo blanco. Este evento depende de la lipoficidad del compuesto (Laks y Pruner, 1989). Los compuestos activos lipofílicos tienden a ser transportados eficientemente a los sitios activos donde puede manifestarse su toxicidad. Lo anterior coincide con lo expuesto por Harborne (1983) respecto a que en diferentes especies de hongos, la actividad antifúngica de las flavonas completamente metoxiladas decrece en gran medida cuando el grupo metilo en la posición 5 se retira y lo sustituye un grupo hidroxilo. Esta diferencia en la actividad puede deberse a que la membrana puede captar mayor cantidad de las flavonas polimetoxiladas ya que la metoxilación de los grupos fenólicos disminuye la hidrofiliidad de la flavona.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que *B. glutinosa* es una especie con alto potencial para el control de *C. gloeosporioides*.
- Se identificó uno de los compuestos aislados como 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona lo cual constituye hasta donde es de nuestro conocimiento, el primer reporte de un compuesto de *B. glutinosa* con actividad antifúngica en general y contra *C. gloeosporioides* en particular.
- La concentración mínima inhibitoria de la flavona hexametoxilada, para *C. gloeosporioides* es de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Su potencial fungicida es similar al de benomilo.
- Es necesario realizar la evaluación de los compuestos activos de *B. glutinosa* en pruebas de campo, así como las pruebas toxicológicas necesarias para proponer a estos compuestos como una alternativa para el control de las enfermedades causadas por *C. gloeosporioides*

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M.J., Bermejo P., Sánchez-Palomino, S., Chiriboga, X. and Carrasco L. 1999. Antiviral activity of some South American medicinal plants. *Phytother. Res.* 13(2):142-146.
- Agrios, G. N. 1995. *Fitopatología*. 2ª Edición. Editorial Limusa, México D. F. 838 p.
- Alvarez, A. M. and Nishijima, W. T. 1987. Postharvest diseases of papaya. *Plant Disease* 71:681-686.
- Araujo, S. R. 1997. Evaluación de la actividad fungicida y antiaflatoxigénica de extractos de plantas del estado de Sonora para el control de *Aspergillus flavus* y *A. Parasiticus*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. 74 p.
- Amaral D.F., Arruda, M.S.P., Arruda, A.C., Müller, A.H., Pantoja, L.L.J. and Lima, T.S. 2001. Flavones from the leaves of *Ficus glomeriella*. *J. Braz. Chem. Sci.* 12(4):538-541.
- Bandoni, A.L., Medina, J.E., Rondina, V.D. and Coussio, J.D. 1978. Genus *Baccharis* L. I: Phytochemical analysis of a non polar fraction from *B. Crispa* Sprengel. *Planta Med.* 34:328-331.
- Banik, A.K., Kaiser, S.A.K.M. and Dhua, R.S. 1996. Evaluation of mango fruits in storage for resistance against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) and *Diplodia* stem end rot (*Diplodia natalensis* Pole Evans). *J. Trop. Agr.* 34: 121-124.
- Bommarito, S.G., Greenough, R.D. and Tudela, A.F. 1998. Inhibition of mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) and stem-end rot (*Phomopsis magniferae*) by ethanolic leaf extracts of neem (*Azadiractha indica* Juss) in the Northern Mariana Islands. *Phytopathology*, 88:59.
- Campas, G. 1996. Evaluación de extractos vegetales para el control de cenicilla (*Erysiphe cichoracearum* De Candolle) en el cultivo de calabacita italiana (*Cucurbita pepo*). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Sonora. 95p.

Ceñal, J.P. Giordano, O.S., Rossomando, P.C. and Tonn, C.E. 1997. Neoclerodane diterpenes from *Baccharis crispa*. J. Nat. Prod. 60:490-492.

Corrales C.G. y López S.H. 2001. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres de tres regiones del estado de Sonora en el control del insecto *Prostephanus truncatus* (Horn) e inhibición del crecimiento de dos especies de hongos de los géneros, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. 122 p.

Cuñat, P. Primo, E. Sanz, I. Garcerá, M.D. March, C.G., Bowers, W.S. Martínez-Prado, R. 1990. Biocidal activity of some spanish mediterranean plants. J. Agric. Food Chem. 38:497-500.

DiSalvo, A.F. 1974. Antifungal properties of a plant extract I. Source and spectrum of antimicrobial activity. Mycopathologia et Mycologia applicata 54 (2): 215-219.

Dickman, M. B. 1993. *Colletotrichum gloeosporoides*. Department of Plant Pathology. University of Hawaii. www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/c-gloeo.html.

Domínguez, X.A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Primera Edición. Editorial Limusa, México. 183 p.

Duke, S. O. 1990. Natural pesticides from plants. In: Advances in new crops. Janick, J. E. (eds.), Timber Press, Portland, Or. 30-48 p.

Eckert, J. W. and Ogawa, J. M. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. Ann. Rev. Phytopathol. 13:147-167.

Ecobichon, D. J. 1991. Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons. Amdur, M. O., Doull, J. and Klassen, C.D. (eds.) 4th edition. McGraw Hill, Inc. New York, 562-622 p.

El-Shafae, A.M. 2002. Bioactive polymethoxyflavones and flavanone glycosides from the peels of *Citrus deliciosa*. Chin. Pharm. J. 54: 199-206.

Environmental Protection Agency. 2002. Federal register: Benomyl cancellation order. www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST

Fitzell, R.D. and Peak, C.M. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Ann. Appl. Biol.* 104: 53-59.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2002. FAOSTAT Agriculture data. www.apps.fao.org/page/collections.

Foster, B.C., Foster, M.C., Vandenhoeck, S., Krantis, A., Budzinski, J.W., Arnason, J.T., Gallicano, K.D. and Choudri, S. 2001. An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 4(2): 176-184.

Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1014-1020.

Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species for anthracnose disease of various fruits. *Plant Disease* 82(6): 596-605.

Futagawa, M., Rimando, A.M., Tellez, M.R. and Wedge, D.E. 2002. pH modulation of Zopfiellin antifungal activity to *Colletotrichum* and *Botrytis*. *J. Agric. Food Chem.* 50:7007-7012.

Galati, E.M., Miceli, N., Taviano, M.F., Sanogo, F. and Raneri E. Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Ageratum conyzoides*. *Pharmaceutical Biology.* 39(5): 336-339.

Guzmán, G. 1998. Cultivos de papaya. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. www.mag.go.cr/inf11f.htm

Harborne, J.B. 1983. The flavonoids of the Rutales, in *Plant and fungal toxins*, ed. by Keeler R.F. and Tu A.T. Marcel Dekker, Academic Press. New York.

Hewitt, H. G. 1998. *Fungicides in crop protection*. CABI publishing, United Kingdom. 229 p.

Jeffries, P., J. C., Jeger, M. L. and Plumbley, R. A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruits. *Plant Pathology.* 39: 343-366.

Kobaisy, M., Tellez, M.R., Weber, C.L., Dayan, F.E., Schrader, K.K., Wedge, D.E. 2001. Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf

(*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. J.Agric. Food Chem. 49: 3768-3771.

Kuo, K.C. 1999. Germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. Proc. Nat. Sci. Counc. ROC(B) 23(3): 126-132.

Kuo, K.C. 2001. Sensitivity of mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, to the fungicide prochloraz in Taiwan. Proc. Nat. Sci. Counc. ROC(B) 25(3):174-179.

Landels, S., Bohlmann, G. M., Janshekar, H and Ishikawa, M. 1995. Marketing research report on fungicide en: Chemical Economic Handbook. Piglet.sri.com/CNI/1997/March-April/Article04.html

Laks, P.E. and Pruner M.S. 1989. Flavonoid biocides: structure/activity relations of flavonoid phytoalexin analogues. Phytochemistry 28(1):87-91.

Lentza-Rizos, Ch. 1990. Ethylenethiourea (ETU) in relation to use of bisdithiocarbamates fungicides. Rev. Env. Cont. Toxicol. 115:1-37.

March, L., Sanz, I. and Primo Y. E.: 1991. Antimicrobial activities on Mediterranean plants. Zentrabl. Mikrobiol. 146:291-295.

McMullen, M.P. 2002. North Dakota Field Crop Fungicide Guide. 51 pp. www.ndsu.nodak.edu/plantpath/fungguide/sec1.htm

Meazza G., Dayan, F.E. and Wedge D.E. 2003. Activity of quinones on *Colletotrichum* species. J. Agric. Food Chem. 51 (13): 3824-3828.

Meepagala, K.M., Sturtz, G. and Wedge, D.E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. Var. *dracunculus*. J. Agric. Food Chem. 50:6989-6992.

Mena-Nevárez, G., Nieto-Angel, D., Noriega-Cantú, D., Téllez-Ortiz, D., Mora-Aguilera, G. y Cárdenas-Soriano E. 1999. Epidemiología y control de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en mango. Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad. Avances en la investigación. www.colpos.mx/ifiit/entacar/avances/061.htm

Montes-Belmont, R., Cruz-Cruz, V., Martínez-Martínez G., Sandoval-García, G., García-Licona, R., Zilch-Domínguez, S., Bravo-Luna, L., Bermúdez-Torres, K., y

- Flores-Moctezuma, H.E. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(2):125-131.
- Oliva, A., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Harries, D., Hale, A.L., Aliotta, G. and Duke, S.O. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J. Agric. Food Chem.* 51:890-896.
- Ortuño, A., Arcas, M., Benavente, O., Juana, M.B. and del Rio J. 1998. Antifungal properties of polymethoxilated flavones in *Citrus* sp. 2nd Intl. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. www.mdpi.org/ecsoc/
- Osbourne, A.E. 1999. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genetics and Biology* 26:163-168.
- Pandey, V. N. and Dubey, N. K. 1994. Antifungal potencial of leaves and essential oils from higher plants against soils pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 26 (10):1417-1421.
- Panichpol, K. and Watwermen P.G. 1978. Novel flavonoids from stem of *Popowia cauliflora*. *Phytochemistry*, 17:1363-1367.
- Ploetz, R.C., Benscher, D., Vázquez, A., Colls, A., Nagel, J. and Schaffer, B. 1996. A reexamination of mango decline in Florida. *Plant Disease* 80:664-668.
- Ploetz, R. C., Haynes, J.L., Mullins, G. and Stanford, G. 1999. New fungicides for controlling *Colletotrichum* induced fruit diseases in South Florida. Tropical Research and Education Center, IFAS; University of Florida. Valencia.raf.uf.edu/jkbu/rsns/6.html
- Pinkas, J., Lavie, D. and Chorin, M. 1968. Fungistatic constituents in citrus varieties resistant to the mal-secco disease. *Phytochemistry* 7:169-174.
- Rahalison, L., Benathan, M. Monod, M., Frenk, E., Gupta, M.P. Solis, P. N., Fuzzati, N., and Hostettman, K. 1995. Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. *Planta Med.* 61:360-362.
- Repetto, M., Martínez, D. y Sanz, P. 1995. Actualización de la toxicología de plaguicidas. En: Repetto M. (ed) *Toxicología avanzada*, ediciones Díaz de Santos, S. A. España, 557-601 p.

- Reyes, R. F. 1995. Comparación de los extractos alcohólicos y acuosos de *Anthemis nibilis* y caracterización de un nuevo glucósido de *Stevia subpubescens* LAG. Tesis de Licenciatura. Universidad de Michoacana de San Nicolás.
- Roltman, J.N. and James, L.F. 1985. Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. *Phytochemistry* 24:835-848.
- Roja, M y Weidauer H. 2002. Fitoterapia doméstica Mayo-yoreme del Norte de Sinaloa: Batamote. *Tlahui-Medic*, 14:1-3.
- Sharma, I.M. and Badiyala, S.D. 1998. Screening on mango cultivars for susceptibility to *Colletotrichum gloeosporioides* during different seasons. *Indian Phytopath.* 51(2):199-200.
- Swart, G.M. 1999. Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango. Tesis doctoral. Universidad de Pretoria. 150 p.
- Timmer, L. W., Brown, G. E. and Zitko, S. E. 1998. The role of *Colletotrichum spp.* in postharvest anthracnoses of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Disease.* 82(4): 415-418p.
- Tortoriello J. and Aguilar-Santamaría, L. 1996. Evaluation of the calcium-antagonistic, antidiarrhoeic and central nervous system activities of *Baccharis serraefolia*. *J. Ethnopharmacol* 53(3):157-163.
- Verástegui, M.A. Sánchez, C.A. Heredia, N. L. and García-Alvarado, J. S. 1996. Antimicrobial activity of three major plants from the Chihuahuan desert. *J. Ethnopharmacol.* 52(3): 175-177.
- Vidales, J. M. 1998. Cómo controlar la antracnosis y la roña del aguacate. El Aguacatero 4. www.aproam.com/aguacater4.htm
- Vinggaard, A.M. Nellemann, C. Dalgaard, M. Jorgensen, E.B. and Andersen, H.R. 2002. Antiandrogenic effects *in vitro* and *in vivo* of the fungicide prochloraz. *Toxicological Sciences* 69: 344-353.
- Wilson, C.L., Solar, J. M., El Ghaouth, A. and Wisniewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant disease* 81(2):204-210.

Zamora-Magdaleno, T., Cárdenas-Soriano, E., Cajuste-Bontemps, J. y Colinas-León, M.T. 2001. Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotricum gloeosporioides* Penz. en fruto de aguacate 'Hass'. *Agrociencia* 35:237-244.